

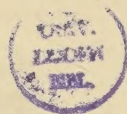
DURCHFLOSSZYTOMETRISCHE MESSUNGEN VON DNS,
RNS UND INTRAZELLULÄREM PH BEI
MENSCHLICHEN LEUKÄMIEZELLEN.

NIELS KREJCI

~~1987~~

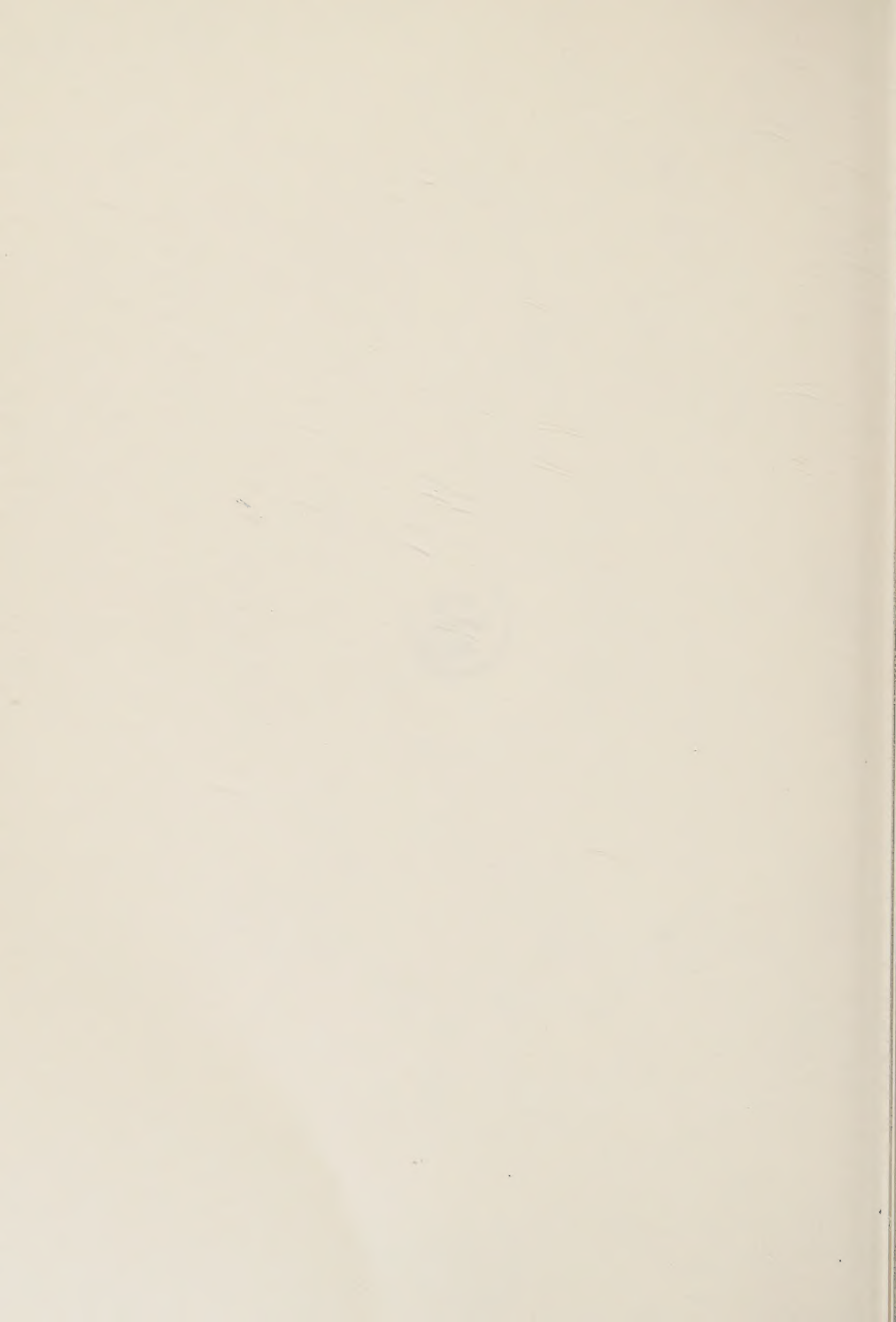
Disbui. München

1988





Digitized by the Internet Archive
in 2026



Aus dem Max-Planck-Institut für Biochemie in Martinsried

Vorstand Prof. Dr. Huber

DURCHFLUßZYTOMETRISCHE MESSUNGEN VON DNS, RNS UND
INTRAZELLULÄREM PH BEI MENSCHLICHEN LEUKÄMIEZELLEN.

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
NIELS KREJCI

aus
FRANKFURT a.M.

Jahr
1987

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. G. Valet

Mitberichterstatter: Prof. Dr. H. Rabes

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: Dr. rer. nat. L. Rüssmann

Dekan: Prof. Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 11.02.1988

INHALTSVERZEICHNIS

=====

Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen und Substanzen.

EINLEITUNG

- 1 Häufigkeit der Leukämien.
- 2 Bisherige Methoden der Diagnostik und Prognosebestimmung.
- 3 Prinzip und Möglichkeiten der Fluoreszenz-Durchflußzytometrie
- 4 Fragestellung

MATERIAL UND METHODEN

- 1 Patientenauswahl und Probengewinnung.
- 2 Zellaufarbeitung und Färbung.
 - 2.1 ADB/PJ-Färbung.
 - 2.1.1 Lebende Zellen; intrazellulärer pH-Wert.
 - 2.1.2 Tote Zellen; DNS-Gehalt.
 - 2.2 AO/DIOC6-Färbung.
 - 2.3 Eichpartikelmessung.
- 3 Durchflußzytometrische Messung und Auswertung.
 - 3.1 Aufbau des Fluvo-Metricell-Durchflußzytometers.
 - 3.2 Volumenmessung.
 - 3.3 Fluoreszenzmessung
 - 3.4 Datenaufzeichnung und Datenauswertung.
- 4 Graphische Darstellung und Definition von Zellpopulationen.
 - 4.1 Das 2-Parameter-Diagramm.
 - 4.2 Definition von Zellgruppen mittels Feldern.
 - 4.3 Diagramme und Felder der ADB/PJ-Färbung.
 - 4.4 Diagramme und Felder der AO/DIOC6-Färbung.
- 5 Auswertung nach morphologischen Diagnosen.

ERGEBNISSE

- 1 ADB/PJ-Färbung.
 - 1.1 Erfassung des Anteils toter Zellen.
 - 1.2 Erfassung des Anteils großer Zellen.
 - 1.3 Erfassung des Anteils der Granulozyten.
 - 1.4 Erfassung der Anteils der Lymphozyten.
 - 1.5 Erfassung des intrazellulären pH-Wertes bei Granulozyten und Lymphozyten.
 - 1.6 Erfassung des Anteils polyploider Granulozyten mit "großen Zellen".
- 2 AO/DIOC6-Färbung.
 - 2.1 Erfassung des Anteils der Leukozyten.
 - 2.2 Erfassung des Anteils der Erythrozyten.
 - 2.3 Erfassung des Anteils der Retikulozyten.
 - 2.4 Erfassung des Anteils der Thrombozyten.
 - 2.5 Erfassung des Rot/Gelb-Fluoreszenzquotienten bei Granulozyten mit "großen Zellen".

DISKUSSION

ZUSAMMENFASSUNG

LITTERATURVERZEICHNIS

DANKSAGUNG

LEBENS LAUF

Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen und Substanzen

ADB	= 1,4-Diacetoxy-2,3-dicyanobenzol (Molekulargewicht MG: 244,0)
AO	= Acridinorange (MG: 301,8)
DCH	= 2,3-Dicyanhydrochinon (MG: 160,0)
DIOC6	= 3,3-Dihexyloxacarbocyanin (MG: 572,3)
DMF	= Dimethylformamid
DMSO	= Dimethylsulfoxid
PJ	= Propidium-Jodid (MG 668,4)
TRIS	= Iris(hydroxymethyl)-aminomethan
TBS-Puffer	= 10 mm TRIS, pH 7,1, 0,95% (G/V) NaCl, 300 mOsm, 16 mSiemens/22 C
ADB/PJ - Färbung	= 1 mg/ml ADB + 2 mg/ml PJ in wasserfreiem DMF
AO/DIOC6-Färbung	= 0,4ml AO (1mg/ml in DMF) + 30 ul DIOC6 (0,3mg/ml) in Ethanol + 0,6ml DMF

TABLE 1. Summary of the data for the 1961-1962 season.

1. Total number of birds banded	100
2. Number of birds banded in the morning	50
3. Number of birds banded in the afternoon	50
4. Number of birds banded in the evening	0
5. Number of birds banded in the night	0
6. Number of birds banded in the day	100
7. Number of birds banded in the night	0
8. Number of birds banded in the day	100
9. Number of birds banded in the night	0
10. Number of birds banded in the day	100
11. Number of birds banded in the night	0
12. Number of birds banded in the day	100
13. Number of birds banded in the night	0
14. Number of birds banded in the day	100
15. Number of birds banded in the night	0
16. Number of birds banded in the day	100
17. Number of birds banded in the night	0
18. Number of birds banded in the day	100
19. Number of birds banded in the night	0
20. Number of birds banded in the day	100

LEITUNG

=====

1) Häufigkeit der Leukämien.

Die malignen Entartungen des hämatopoetischen Systems haben in der Bundesrepublik Deutschland eine Mortalitätsrate von rund 3,5% (Krebsatlas der BRD 1984). Dabei sind die drei großen Gruppen, die myeloische Leukämie (ICD-Nr. 204), die lymphatische Leukämie (ICD-Nr. 205) und die der anderen Leukämie-formen (ICD-Nr. 207) in etwa gleich häufig. In den letzten 30 Jahren zeigte sich eine leichte Zunahme der leukämie-bedingten Sterblichkeit für das männliche Geschlecht, während bei Frauen nur zwischen 1950 und 1960 ein Anstieg erkennbar war. Ein Vergleich mit anderen Zivilisationsstaaten zeigt, daß die Inzidenzen in der Bundesrepublik in einem mittleren Bereich liegen (22). Trotz neuerer Fortschritte in Diagnose und Therapie ist die Prognose der Leukämie im Erwachsenenalter meist infaust (43,45). Eine wesentliche Rolle für die Einschätzung der Lebenserwartung spielt die Einordnung der Leukämien in die verschiedenen Untergruppen.

Hauptziel jeder labormäßigen Untersuchung und Klassifikation ist eine Verbesserung des Krankheitsverlaufes durch eine der individuellen Krankheit optimal angepaßten Therapie.

2) Bisherige Methoden der Diagnostik und Prognosebestimmung

Neuere Aspekte erhielt die hämatologische Forschung vor allem durch die Biochemie und Immunologie. Besondere Schwerpunkte liegen dabei auf der Differenzierung von Leukämie-Subtypen mittels Enzymreaktionen (31,32,35,65), Oberflächenantigenen (33,62,66), DNA-Messungen (14,20,37,38,39,40) und verschiedenen Färbungen. Bei der labormäßigen Untersuchung von Zellen lassen sich 2 grundsätzliche Ansätze unterscheiden. Die klassische Methode der Zytologie und Histologie ist das Färben fixierter Zellen mittels spezifischer Reagenzien und die

mikroskopische Auswertung des Präparats. Ihr Vorteil ist die Beurteilbarkeit von Einzelzellen in der Cytologie oder von bestimmten Zellpopulationen und deren Verhalten im Gewebsverband in der Histologie. Die morphologischen Methoden sind zur Zeit die verbreitetsten und zuverlässigsten Hilfsmittel zur Diagnose Krebs. Durch die Einführung der Histo-Immunfluoreszenz wurden sie weiter verbessert. Der Nachteil morphologischer Methoden liegt in der begrenzten Zahl der betrachteten Zellen welche repräsentativ für die Gesamtheit angenommen werden müssen, der Begrenzung auf semiquantitative Aussagen und in dem nicht unerheblichen Zeitaufwand der von einem erfahrenen Auswerter investiert werden muß. Zudem kommen viele pathologischen Veränderungen nur an lebenden Zellen, nicht jedoch an fixierten Zellen zum Ausdruck.

Biochemische oder immunologische Analysen ergeben dagegen quantitative Aussagen über die untersuchten Zellen. Diese basieren jedoch auf Durchschnittswerten aller untersuchten Zellen und enthalten keine Information über die Einzelzelle. Enthält die zu untersuchende Probe mehrere Zellpopulationen, sind vorangehende Trennungsschritte notwendig. Zudem können meist entweder nur Untersuchungen der Zelloberfläche vorgenommen werden oder eine Analyse des Zellinhaltes, wozu eine Lyse erforderlich ist.

Von großem Nutzen wäre ein Ansatz welcher die Vorteile beider Methoden, nämlich Einzelzellbeobachtung und Biochemie vereint. Die Fluoreszenz-Durchflußcytometrie erfüllt diese Bedingungen.

3) Prinzip und Möglichkeiten der Fluoreszenz-Durchflußcytometrie (12,15,19,65).

Das Konzept der Fluoreszenz-Durchflußcytometrie (FCM) besteht darin, daß biochemisch auf spezifische Weise fluoreszent gefärbte Zellen, zu einem Strahl gebündelt, mit hoher Geschwindigkeit (ca. 1000 Zellen/sec.) eine kleine zylindrische Meßöffnung (Durchmesser 70 µm, Länge 80 µm) durchfließen. Das Zellvolumen wird im Moment des Durchtritts nach dem Coulter-Patent (29)(anhand der Erhöhung des elektrischen Widerstandes in der Meßöffnung) gemessen. Gleichzeitig

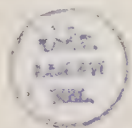
wird die Zelle von einem starken UV-Lichtstrahl im Auflicht beleuchtet. Damit werden die in ihr enthaltenen Farbstoffmoleküle zur Fluoreszenz angeregt. Das emittierte Licht wird nach Aufnahme durch ein 100-fach Objektiv mit einer hohen numerischen Apertur von 1,26 durch einen Farbteilerspiegel in zwei Wellenlängenbereiche zerlegt, die zwei getrennten Photoverstärkerröhren zugeführt werden. Je nach Farbstoff können auf diese Weise zahlreiche Struktur- und Funktionsparameter bestimmt werden. So zum Beispiel DNA, RNA, Antigene, Zellprotein, bzw. intrazelluläres pH, Enzymaktivitäten, Redoxzustand und intracelluläres Calcium.

Das am Max-Planck-Institut für Biochemie in Martinsried entwickelte Fluvo-Metricell-Fluoreszenzdurchflußcytometer erlaubt eine gleichzeitige, quantitative Messung von Zellvolumen und zwei Fluoreszenzparametern an lebenden und fixierten Zellen. Es verbindet die Einzelzellbetrachtung mit einer hohen Meßgeschwindigkeit und ist bis hin zur Datenausgabe automatisierbar. Sein besonderer Vorzug liegt in der exakten elektrischen Messung des Zellvolumens. Dieses Fluvo-Metricell-Durchflußcytometer wurde für alle Zellanalysen der nachfolgenden Studie verwandt.

4) Fragestellung

Unter Bewertung der klinischen Bedeutung der malignen hämatopoetischen Erkrankungen einerseits und der neuen technischen und biochemischen Möglichkeiten auf dem Gebiet der Fluoreszenz-Durchflußcytometrie andererseits wurde folgende Fragestellung entwickelt:

1. Bietet die schnelle und unkomplizierte fluoreszenz-durchflußzytometrische Analyse von Blut- und Knochenmarksproben eine Hilfe bei der Diagnose von Leukämien ?
2. Bietet die Fluoreszenz-Durchflußzytometrie eine Hilfe bei der Einteilung der Leukämien in verschiedene Subtypen ?
3. Wie verhalten sich zelluläre Funktions- und Strukturparameter in Blut und Knochenmark bei normalen sowie bei leukämischen Blut- und Knochenmarksproben ?



MATERIAL UND METHODEN

=====

1) Patientenauswahl und Probengewinnung

Die in der Studie verwendeten Blut- und Knochenmarksproben stammen von Patienten der III. medizinischen Klinik des Klinikums Großhadern bei München. Sie wurden freundlicherweise von Prof. Sauer zur Verfügung gestellt. Die Indikationen zu den Knochenmarkspunktionen waren: Die Diagnosesicherung einer vermuteten bzw. die Verlaufskontrolle einer gesicherten Leukämie (n=31), die Abklärung einer anderen hämatologischen Erkrankung (n=5), und andere Gründe (n=3). Das heparinisierte (10 IE/ml) Knochenmarkspunktat (50-150 μ l) wurde sofort nach Entnahme in einem sterilen Eppendorfgefäß (1,4ml) verschlossen und, wie auch das entnommene Heparinblut, bei 4 Grad Celsius gelagert. Der Transport in das Max-Planck-Institut erfolgte auf Eis innerhalb einer Stunde nach Entnahme. Die Aufarbeitung schloß sich unmittelbar daran an.

2) Zellaufarbeitung und Färbung

Von Blut und Knochenmark wurden jeweils 5 Mikroliter in 1250 Mikroliter TBS-Puffer durch mehrfaches Hin- und Hersaugen mit einer 1ml-Kolbenhubpipette mit Plastikspitze (Eppendorf, Hamburg) unter Vermeidung von Luftblasen gut verteilt. Die so gewonnene Einzelzellsuspension diente als Grundlage für alle weiteren Ansätze.

2.1) ADB/PJ-Färbung

2.1.1) Lebende Zellen; Intrazelluläres pH.

Zu 250 Mikroliter der vorbereiteten Zellsuspension wurden jeweils 5 Mikroliter der ADB/PJ-Färbelösung zugegeben und bei Raumtemperatur 5 Minuten bis zur Messung inkubiert. Während dieser Zeit diffundiert das ungeladene und gut membrangängige ADB in die Zellen und wird dort von unspezifischen Esterasen zu DCH und Acetat gespalten. In lebenden

Zellen akkumuliert das geladene und fluoreszente DCH, wodurch die Zellen deutlich blau fluoreszieren. Tote Zellen können den DCH-Farbstoff nicht halten, weil er durch die beschädigte Zellmembran ausdiffundiert. Sie fluoreszieren daher bei einer Anregung zwischen 300 und 400 nm nicht. Wird das emittierte Fluoreszenzlicht im ersten Fluoreszenzkanal des Durchflußcytometers zwischen 418 und 440 nm und im zweiten Fluoreszenzkanal des Instruments zwischen 460 und 700 nm aufgefangen, so ist die Fluoreszenz im ersten Kanal ein Maß für die Esteraseaktivität der Zelle. Das Verhältnis beider Fluoreszenzen ist ein Indikator für den intrazellulären pH-Wert da die Fluoreszenzwellenlänge des DCH abhängig vom pH der Umgebung ist.

2.1.2) Tote Zellen; DNS-Gehalt

Das in der ADB/PJ-Färbelösung enthaltene Propidium-Jodid kann nur die Zellmembranen von geschädigten bzw. toten Zellen durchdringen. Es bindet an die DNA-Doppelhelix und färbt diese rot. Die Intensität der Rot-fluoreszenz ist ein Maß für den DNS-Gehalt der Zelle. Da Propidium-Jodid selektiv die toten Zellen färbt, ADB jedoch nur die lebenden interferieren diese beiden Färbungen nicht miteinander.

2.2) AO/DIOC6-Färbung

Von der Ausgangssuspension wurden je 500 Mikroliter mit je 5 Mikrolitern AO/DIOC6 - Färbelösung durchmischt und 10 Minuten bei Raumtemperatur bis zur Messung inkubiert. In dieser Zeit bindet sich das gut membrangängige Acridinorange an die DNA und RNA der Zellen. Das Fluoreszenzmaximum des RNA-gebundenen AO liegt im Roten, das des DNA-gebundenen im Grünen. DIOC6 ist ein geladener Fluoreszenzfarbstoff, der in Abhängigkeit vom Membranpotential in die Zellen eindiffundiert. Gut gefärbt werden damit Thrombozyten, Granulozyten und Lymphozyten. Durch die Überlagerung der AO und der DIOC6-Fluoreszenz lassen sich die einzelnen Zellpopulationen fluoreszenzoptisch besser voneinander trennen. Das anregende Licht hat in diesem Ansatz eine Frequenz zwischen 400 und 500 nm. Die Grünfluoreszenz wird zwischen 500 und 540 nm, die Rotfluoreszenz zwischen 550 und 700 nm bestimmt.

2.3) Eichpartikelmessung

Um Zellmessungen über einen langen Zeitraum quantitativ miteinander vergleichen zu können und um einen Konzentrationsstandard zu haben werden vor und evtl. zusätzlich in der Probe fluoreszenzmarkierte, monodisperse, 5 Mikrometer große Latexpartikel gemessen. Die Meßapparatur wird auf deren bekannte Fluoreszenz und Volumen geeicht.

3) Durchflußzytometrische Messung und Auswertung.

3.1) Aufbau des Fluvo-Metricell-Durchflußzytometers

Das Gerät besteht aus einer Meßkammer zur Zellvolumenmessung, einem optischen Teil zur Fluoreszenzmessung (Lampe, Auflichtmikroskop, mehrere Spiegel und Filter) und einem elektronischen Teil zur Verarbeitung der registrierten Impulse. (Abb.1). Diese Kombination ermöglicht die simultane Messung von Zellvolumen und zwei verschiedenen Fluoreszenzen mit einer Geschwindigkeit von ca. 1000 Zellen/sek.

3.2) Volumenmessung.

Die mit TBS gefüllte Meßkammer ist in zwei Abschnitte unterteilt, die durch eine enge zylindrische Meßöffnung von 50 μ m Durchmesser und 80 μ m Länge miteinander verbunden sind. Über die beiden Kammerteile ist ein konstanter Gleichstrom angelegt. Wenn eine Zelle durch die Öffnung tritt erhöht sich der Widerstand im Stromkreis. Dies führt nach dem Ohmschen Gesetz zu einem kurzfristigen Spannungsimpuls, der über zwei Elektroden abgenommen werden kann. Die maximale Höhe des Impulses ist dem Zellvolumen proportional. Die Zellen werden hydrodynamisch in einem feinen Flüssigkeitsstrahl gebündelt, durch die Mitte der Meßöffnung gelenkt und nach dem Austritt sofort seitlich abgesaugt.

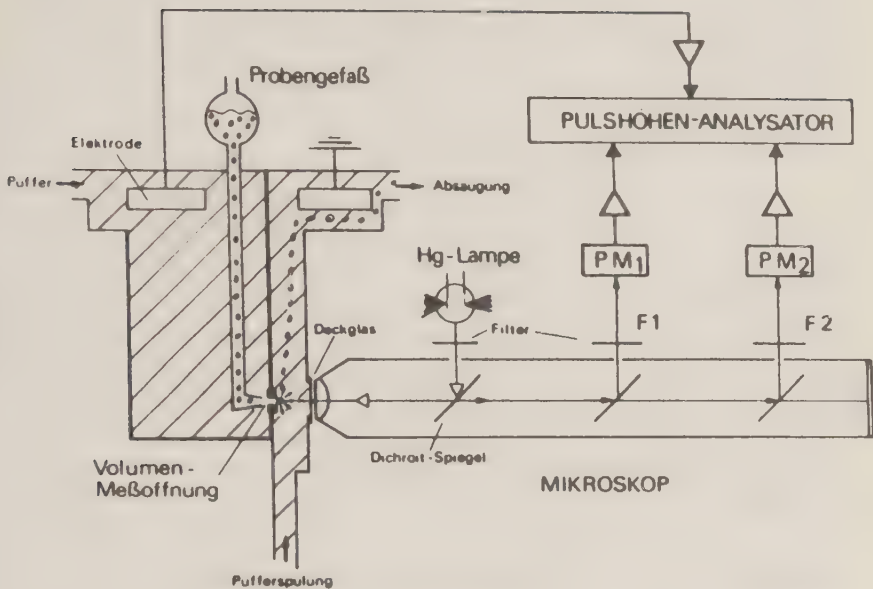


Abb. 1: Schema des Fluvo-Metricell-Durchflußzytometers (PM = Photoröhre, F1 = Fluoreszenzlichtkanal 1, F2 = Fluoreszenzlichtkanal 2).

3.3) Fluoreszenzmessung

Beim Austritt aus der Meßöffnung treten die Zellen in einen Bereich starker UV-Bestrahlung ein, welches von einer Quecksilberlampe kommend, über das Mikroskopobjektiv auf das Meßloch gerichtet ist. Wurden die Zellen zuvor mit einem Fluoreszenzfarbstoff gefärbt, dann emittieren sie längerwelliges Licht, das von demselben Objektiv aufgefangen wird. Durch einen Farbteilerspiegel (Dichroit) wird es vom Anregungslicht getrennt und mit Hilfe eines weiteren Spiegels auf zwei Photomultiplier verteilt. Die verwendeten Filter und Spiegel sind je nach Meßvorhaben austauschbar.

3.4) Datenaufzeichnung und Datenauswertung.

Die von jeder Zelle gleichzeitig anfallenden 3 Meßwerte (Zellvolumen, Fluoreszenz 1 und 2) werden logarithmisch verstärkt, durch Analog-Digital-Wandler mit einer Auflösung von 128 Stufen digitalisiert und mit einem Computer fortlaufend auf Magnetband geschrieben.

Durch ein Computerprogramm werden aus den gespeicherten Einzeldaten jeder Zelle Ein- und Zweiparameter-Histogramme erstellt und ausgewertet. Damit werden beliebige Koordinatenfelder bzw. Zellpopulationen quantitativ erfassbar (s.u.). Es erfolgt eine graphische Auszeichnung der zweidimensionalen Histogramme mit Angabe der Zellhäufigkeit.

4) Graphische Darstellung und Definition von Zellpopulationen

4.1) Das 2-Parameterdiagramm

Als Ergebnis einer Zellmessung liefert das Fluvo-Metricell-Durchflußzytometer einen Wert für das Zellvolumen und zwei Fluoreszenzwerte. Bei der Darstellung der Zellen in einem 2-Parameterdiagramm können diese 3 Meßgrößen (Volumen, Fluoreszenz 1 und Fluoreszenz 2) beliebig auf die Abszisse und die Ordinate angetragen werden. Wird eine der Fluoreszenzen gegen das Zellvolumen dargestellt,

so bewährt es sich das Volumen als Abszisse anzutragen. Ebenfalls möglich ist die Belegung einer Koordinate mit einer Einheit, die sich aus dem Quotienten der beiden Fluoreszenzen ergibt. Auch hier belegt man zweckmäßigerweise die Abszisse mit dem Zellvolumen und die Ordinate mit dem Quotient aus den Fluoreszenzwerten.

Entsprechend der von ihr gemessenen Werte kann jeder Zelle ein definierter Platz im 2-Parameterdiagramm zugewiesen werden. Die Häufung von gleichartigen Zellen an einem bestimmten Ort wird graphisch durch Verwendung von "Höhenlinien" dargestellt. Die Höhenlinien umfassen Flächen deren Zellzahl in einem bestimmten Bereich liegt. Die Zellzahl der aufeinanderfolgenden Größenbereiche steigt logarithmisch.

4.2) Definition von Zellgruppen mittels Feldern

Mit Hilfe des Computers lassen sich in das 2-Parameterdiagramm einer Messung nachträglich gerade Linien eintragen, welche ein oder mehrere "Felder" im Histogramm umschließen und damit definieren. Eine Zellgruppe die auf diese Weise von einem Feld umschlossen wird kann isoliert betrachtet werden. Zum Beispiel kann diese Zellgruppe einzeln in einem anderen 2-Parameterdiagramm mit anderer Koordinatenbelegung dargestellt werden. Oder mehrere definierte Zellgruppen eines Diagramms können bezüglich ihrer Zellzahl miteinander verglichen werden.

Die Ergebnisse dieser Studie beruhen maßgeblich auf dem Bemühen, verschiedene Zellpopulationen mittels geeigneter Koordinatenbelegung und Felderwahl voneinander zu separieren und somit der quantitativen Auswertung zugänglich zu machen. Dabei konnte in den meisten Fällen eine gleichbleibende "Maske" aus 2 bis 1 Feldern benutzt werden, die dann über das 2-Parameterdiagramm aller Proben gelegt wurde.

4.3) Diagramme und Felder der ADB-PJ-Färbung

Bei der Zellmessung mit Verwendung der ADB-PJ-Färbung werden durch elektronische Selektion nur Zellen erfaßt die ein bestimmtes Volumen und einen bestimmten Fluoreszenzwert überschritten haben. Die Einstellung wurde so gewählt, daß Erythrozyten und Thrombozyten nicht

registriert werden. Die in den Diagrammen zur Auswertung herangezogenen Zellen sind somit fast ausschließlich kernhaltige Zellen. Zelltrümmer liegen bei der Messung knapp über der elektronischen Selektionsgrenze. Sie bilden eine volumenmäßig breit streuende Partikelpopulation, die als "Debris" gekennzeichnet wird.

Darstellung A): Anzahl lebender und toter Zellen.

In diesem Diagramm ist die rote Fluoreszenz 2 (Ordinate) gegen die blaue Fluoreszenz 1 (Abszisse) aufgetragen. Die lebenden Zellen fluoreszieren wegen des in ihnen angehäuften DCH (s.o.) grünblau und liegen damit rechts von den toten Zellen deren mit PJ gefärbte DNA nur rot fluoresziert.

Darstellung B): Anzahl von Lymphozyten, Granulozyten und große Zellen.

In diesem Diagramm ist die blaue Fluoreszenz 1 (Ordinate) gegen das Zellvolumen (Abszisse) aufgetragen. Zur Auswertung kommen nur die Zellen, die in Darstellung A im Feld der "lebenden Zellen" lagen. Die Feldergrenzen der in Darstellung B benutzten Maske wurden so gelegt, daß die Trennung von Lymphozyten und Granulozyten im "Tal" zwischen den beiden Zellpopulationen verlief. Die Abgrenzung der großen Zellen von den Granulozyten erfolgte mittels einer, jeweils um das Äquivalent von 5 linearen Klassen vom Granulozytenmaximum entfernten, um 120 Grad gegen die x-Achse geneigten Linie.

Darstellung C): Intrazellulärer pH-Wert von Lymphozyten und Granulozyten mit großen Zellen.

In diesem Diagramm ist der Quotient aus Fluoreszenz 1 und Fluoreszenz 2 (Ordinate) gegen das Zellvolumen (Abszisse) aufgetragen. Es kommen nur Zellen zur Auswertung die in Darstellung A im Feld "lebende Zellen" lagen. Da der Quotient der Fluoreszenz ein Maß für den intrazellulären pH-Wert ist, kann an der Ordinate eine pH-Skala aufgetragen werden. Die Zellen liegen umso höher je alkalischer sie sind.

Darstellung D): Anzahl der euploiden und aneuploiden Granulozyten mit großen Zellen.

In diesem Diagramm kommen nur die Zellen zur Auswertung die in

Darstellung A) im Feld der "toten Zellen" lagen. Zur statistischen Betrachtung wurden weiterhin nur Proben zugelassen, die mehr als 20 tote Granulozyten enthielten. Da dies nur bei wenigen Blutproben der Fall war, wurden hier die normalen Patientenblutproben und das eigene Kapillarblut zu einer Gruppe zusammengefasst. Ebenso wurde das linksverschobene und das blastenreiche Patientenblut (s.u.) gemeinsam betrachtet.

Im Diagramm ist die rote Fluoreszenz 2 (Ordinate) gegen das Zellvolumen (Abszisse) aufgetragen. Je höher eine Zelle liegt desto mehr gefärbte DNA enthält sie. Das Feld für die aneuploiden Zellen liegt folglich über dem der euploiden. Die Lymphozyten boten in keiner der gemessenen Proben Anhalt für Aneuploidie, so daß auf deren weitere Untersuchung in diesem Diagramm verzichtet wurde.

4.4) Diagramme und Felder der AO/DIOC6-Färbung.

Bei dieser Zellmessung wurden alle Blutzellen registriert, also auch Erythrozyten, Retikulozyten und Thrombozyten.

Darstellung E): Anzahl von Leukozyten, Thrombozyten, Erythrozyten und Retikulozyten.

In diesem Histogramm ist die gelbe Fluoreszenz 1 (Ordinate) gegen das Zellvolumen (Abszisse) aufgetragen. Die verschiedenen Zellpopulationen wie Thrombozyten, Erythrozyten mit Retikulozyten, Lymphozyten und Granulozyten trennen sich gut. Die Retikulozyten enthalten Nukleinsäuren die sich mit AO anfärbt und gehen daher nach oben kontinuierlich aus den Erythrozyten hervor. Rechts aus den Erythrozyten hervorgehend liegen Partikel die aus der Aggregation von Erythrozyten und anderen Zellen oder Zellteilen entstehen. Außerdem kommen auf dem Histogramm die der Probe beigesetzten Eichpartikel zur Darstellung.

Darstellung F): Rot/Gelb-Verhältnis der Granulozyten mit großen Zellen und Lymphozyten.

In diesem Diagramm ist der Quotient der roten Fluoreszenz 2 und gelben Fluoreszenz 1 (Ordinate) gegen das Zellvolumen (Abszisse) aufgetragen. Hier kommen nur die Zellen zur Auswertung, die in Darstellung E als

Leukozyten gekennzeichnet waren. Je röter eine Zelle fluoresziert, umso höher liegt sie im Histogramm. Die Unterscheidung zwischen Granulozyten und Lymphozyten geschieht mittels des Zellvolumens.

5.) Auswertung nach morphologischen Diagnosen

Die gemessenen Blut- und Knochenmarksproben wurden anhand ihrer Morphologie in der panoptischen Färbung nach Pappenheim in Untergruppen aufgeteilt. Die morphologische Auswertung wurde im hämatologischen Labor der III. Medizinischen Klinik des Klinikums Großhadern durchgeführt. Für die Auswertung wurden folgende Gruppen gebildet:

- Blut:

- Eigenes Kapillarblut aus der Fingerbeere (Kontrolle).
- Morphologisch normales Patientenblut.
- Linksverschobenes Patientenblut (granulozytäre Reihe fließend zu unreiferen Vorstufen verschoben; Stabkernige über 5%).
- Blastenblut (Auftreten von Blasten im peripheren Blut; kein fließender Übergang zu den reifen Zellen)

- Knochenmark:

- Morphologisch normales Knochenmark.
- Linksverschobenes Knochenmark (relative und etwa gleichstarke Vermehrung der Myeloblasten und Promyelozyten durch Ausschwemmung der reiferen Formen. Blasten mehr als 3%, Promyelozyten mehr als 8%)
- Blastenmark (isolierte Vermehrung der Myeloblasten über 7%)

Blut und Knochenmarksproben, die eine andere pathologische Morphologie aufwiesen kamen nicht zur statistischen Auswertung oder wurden (bei geringfügigen Anomalitäten) als normales Patientenblut oder Knochenmark gewertet. Es ergab sich folgende Verteilung :

- Blut:

- Eigenblut (EigB.) n = 17
- Normalblut (NorB.) n = 17
- Linksverschobenes Blut (LivB.) n = 12
- Blastenblut (BlaB.) n = 15

- Knochenmark:

- Normalmark (NorK.) n = 19
- Linksverschobenes Mark (LivK.) n = 17
- Blastenmark (Bla.K) n = 18

ERGEBNISSE

=====

1) ADB/PJ-Färbung

1.1) Anteil toter Zellen.

Die Ausrechnung der Blafluoreszenz gegen die Grün- und Rotfluoreszenz der Zellen (Abb.1) erlaubt die Unterscheidung zwischen den mit DCH blau gefärbten lebenden Zellen und den mit Propidium-Jodid rot gefärbten toten Zellen. Die quantitative Auswertung ergibt, daß der Anteil toter Zellen und die Streuung innerhalb der Gruppe im normalen Patientenblut und im eigenen Kapillarblut etwa gleich sind.

Im Mittel liegt der Anteil toter Zellen im normalen Knochenmark über dem von normalen Blutproben.

Die leukämischen Knochenmarksproben enthalten im Mittel einen nochmal höheren Anteil toter Zellen als die normalen Knochenmarksproben.

Der Anteil toter Zellen ist in akut myeloischen Proben höher als in myeloischen Proben.

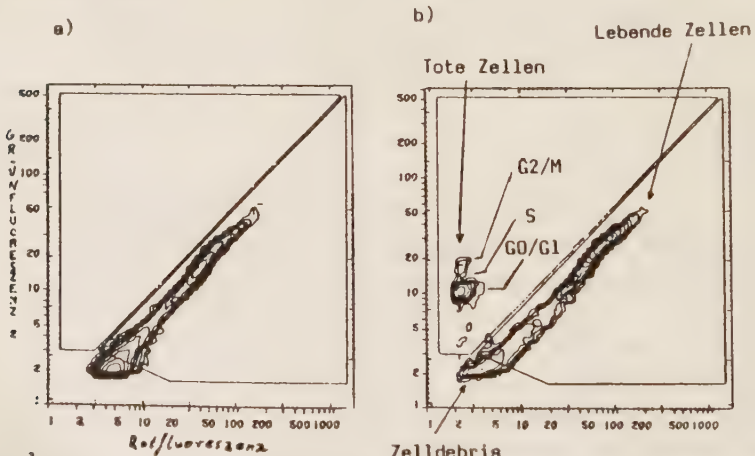


Abb. 1

Beispiel für eine chron. myeloische Blutprobe (a) mit geringem und für eine akut. myeloische Knochenmarksprobe (b) mit hohem Anteil toter Zellen. Bei den toten Zellen sind solche in der Ruhephase des Zellzyklus (G0), in der Synthesephase (S) und in der praemitotischen bzw. mitotischen Phase (G2/M) erkennbar.

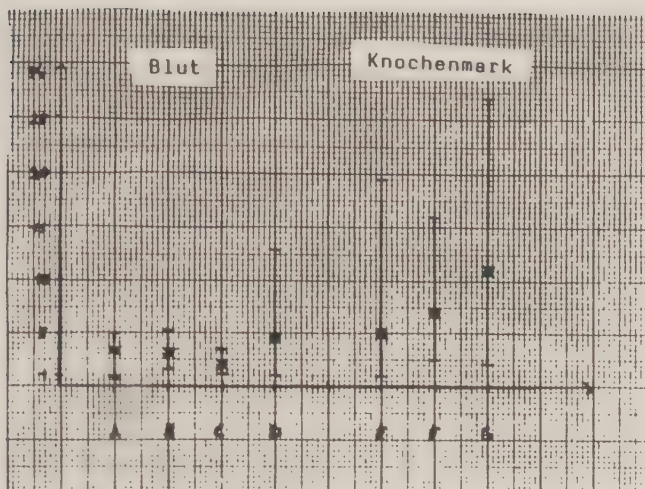


Abb. 2

Prozentualer Anteil toter Zellen: Verteilung bei den verschiedenen Diagnosegruppen. A= Eigenblut, B= normales Patientenblut, C= linksverschobens Pat.blut, D= akut. myeloisches Pat.blut, E= normales Knochenmark, F= chron. myeloisches Knochenmark, G= akut. myeloisches Kn.

Die eingezeichneten Balken entsprechen der Spannbreite zwischen Minimum und Maximum.

Tab. 1

Anteil toter Zellen in Prozent.

	n	$\bar{x}$	S $\bar{x}$	Min	Max	p
Eigenes Kapillarblut	11	3.327	0.6087	0.854	5.072	
Normales Patientenblut	13	3.037	0.4259	1.783	5.263	
chron. myeloisches Blut	8	1.983	0.2740	1.380	3.520	
akut myeloisches Blut	7	4.435	1.594	1.124	13.306	
Normales Knochenmark	14	5.119	1.451	1.113	19.451	
chron myeloisches Kn.mark	10	7.001	1.254	2.518	16.020	
akut myeloisches Kn.mark	9	10.711	2.783	2.191	27.789	< 0.05

S $\bar{x}$ = Standardabweichung des Mittelwertes
= Standardabweichung $\sqrt{n}$

p = Signifikanz bei Vergleich mit den normalen Patientenproben
(Student-test (70, 71))

1.2) Zellvolumen gegen Esterase.

In der Darstellung "Volumen gegen DCH-Fluoreszenz" (Abb 3) ist die Höhe der Fluoreszenz ein Maß für die Esteraseaktivität der Zellen. Es lassen sich kleine Zellen (K; entsprechen im Blut den Lymphozyten), mittelgroße Zellen (M; entsprechen im Blut den Granulozyten) und große Zellen (G; entspricht im Blut unreifen Vorstufen) von den ungefärbten Erythrozyten und den Zellbruchstücken abgrenzen.

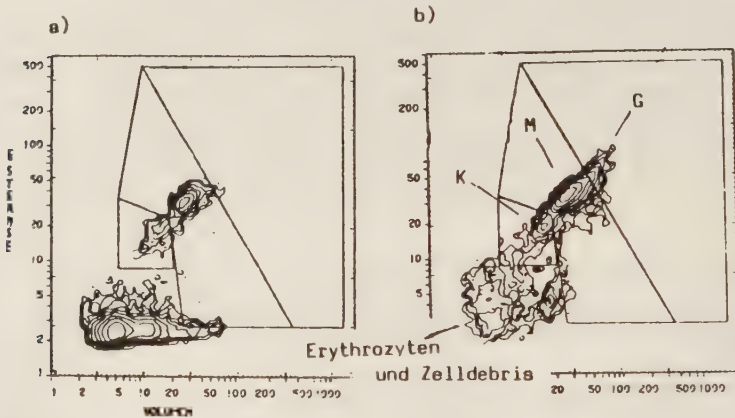


Abb. 3

Beispiel für eine normale Knochenmarksprobe (a) mit unterdurchschnittlichem und für eine akut myeloische Knochenmarksprobe (b) mit überdurchschnittlichem Anteil großer Zellen.

- K = Kleine Zellen (im Blut Lymphozyten)
- M = mittelgroße Zellen (im Blut Granulozyten)
- G = Große Zellen (im Blut unreife Vorstufen)

1.2.1) Blutlymphozyten und kleine Knochenmarkszellen.

Der Anteil der Lymphozyten und die Streuung innerhalb der Gruppe sind im normalen Patientenblut und im eigenen Kapillarblut etwa gleich.

Im Mittel liegt der Anteil der kleinen Zellen im normalen Knochenmark unter dem der Lymphozyten normaler Blutproben.

Leukämische Blutproben enthalten im Mittel einen niedrigeren Anteil Lymphozyten als normales Blut.

Die Streuung innerhalb der Gruppe ist bei den leukämischen Blutproben größer als bei den normalen.

Leukämisches Knochenmark enthält im Mittel einen geringeren Anteil kleiner Zellen als normales Knochenmark.

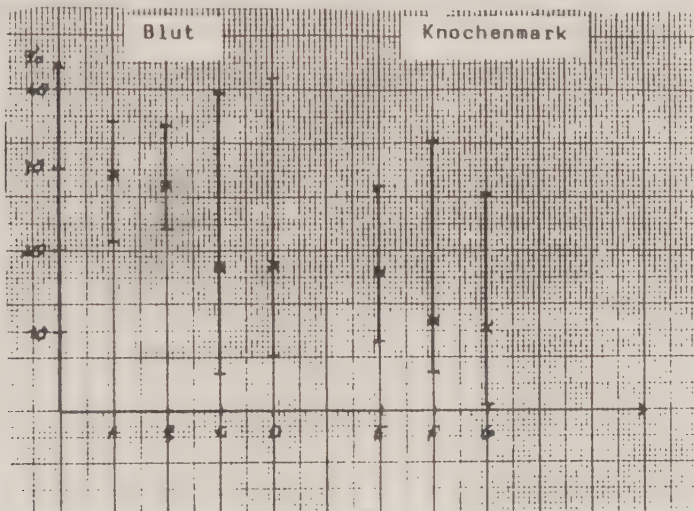


Abb. 4

Prozentualer Anteil von Lymphozyten bzw. kleiner Zellen: Verteilung bei den verschiedenen Diagnosegruppen. A= Eigenblut, B= normales Patientenblut, C= linksverschobenes Pat.blut, D= akut. myeloisches Pat.blut, E= normales Knochenmark, F= chron. myeloisches Knochenmark, G= akut. myeloisches Kn.

Balken wie in Abb.2

Tab. 2

Anteil der kleinen Zellen in Prozent

	n	$\bar{x}$	$S\bar{x}$	Min	Max
Eigenes Kapillarblut	11	29.440	1.562	21.184	36.001
Normales Patientenblut	13	28.647	1.314	22.695	35.557
chron. myeloisches Blut	8	18.011	3.993	5.043	39.852
akut myeloisches Blut	7	18.348	5.498	6.479	41.692
Normales Knochenmark	14	17.472	1.676	8.629	28.091
chron. myeloisches Kn.mark	10	11.388	2.975	4.785	33.823
akut myeloisches Kno.mark	9	10.338	2.413	1.805	27.186

1.2.2) Blutgranulozyten und mittelgroße Knochenmarkszellen.

Der Anteil der Granulozyten und die Streuung innerhalb der Gruppe sind im normalen Patientenblut und im eigenen Kapillarblut etwa gleich.

Im Mittel liegt der Anteil der mittlegroßen Zellen im normalen Knochenmark über dem der Granulozyten von normalen Blutproben.

Leukämische Blutproben enthalten im Mittel einen höheren Anteil Granulozyten als normales Blut.

Die Streuung innerhalb der Gruppe ist bei den leukämischen Blutproben größer als bei den normalen.

Leukämisches Knochenmark enthält im Mittel einen höheren Anteil mittelgroßer Zellen als normales Knochenmark.

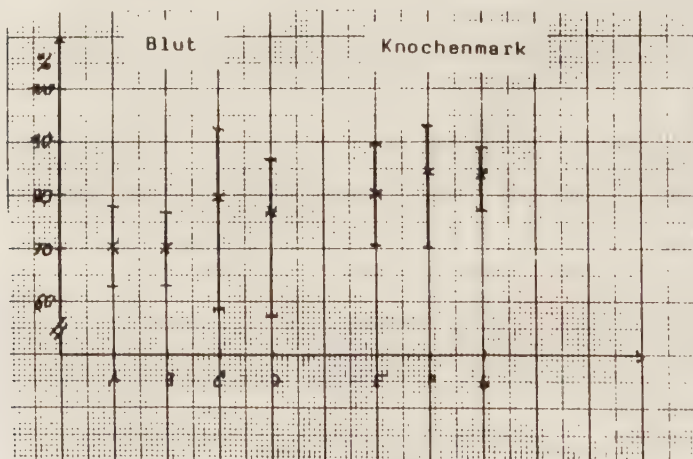


Abb. 5

Prozentualer Anteil von Granulozyten bzw. mittelgroßer Zellen: Verteilung bei den verschiedenen Diagnosegruppen. A= Eigenblut, B= normales Patientenblut, C= linksverschobens Pat.blut, D= akut. myeloisches Pat.blut, E= normales Knochenmark, F= chron. myeloisches Knochenmark, G= akut. myeloisches Kn.

Balken wie in Abb.2

Tab. 3

Anteil der mittelgroßen Zellen in Prozent

	n	$\bar{x}$	S $\bar{x}$	Min	Max
Eigenes Kapillarblut	11	70.421	1.380	63.157	78.132
Normales Patientenblut	13	70.100	1.631	63.181	76.950
chron. myeloisches Blut	8	79.434	4.142	58.671	92.176
akut myeloisches Blut	7	77.012	3.993	57.680	86.971
Normales Knochenmark	14	80.267	1.563	70.573	89.312
chron myeloisches Kno.mark	10	84.679	3.193	70.294	93.275
akut myeloisches Kno.mark	9	83.827	1.822	77.061	88.911

1.2.3) Große Zellen in Blut und Knochenmark.

Der Anteil großer Zellen und die Streuung innerhalb der Gruppe sind im normalen Patientenblut und im eigenen Kapillarblut etwa gleich.

Im Mittel liegt der Anteil großer Zellen im normalen Knochenmark über dem von normalen Blutproben.

Leukämische Blut- und Knochenmarksproben enthalten im Mittel einen höheren Anteil großer Zellen als normale Proben.

Die Streuung der Werte innerhalb einer Gruppe ist bei den normalen Blut- und Knochenmarksproben gering, bei den leukämischen Proben erheblich.

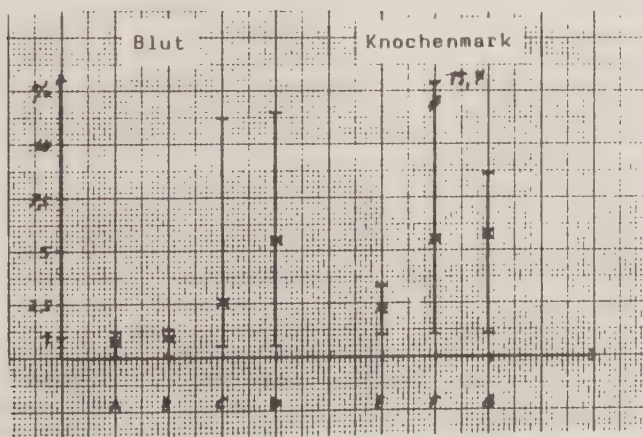


Abb. 6

Prozentualer Anteil von großen Zellen : Verteilung bei den verschiedenen Diagnosegruppen. A= Eigenblut, B= normales Patientenblut, C= linkerverschobenes Pat.blut, D= akut. myeloisches Pat.blut, E= normales Knochenmark, F= chron. myeloisches Knochenmark, G= akut. myeloisches Kn.

Balken wie in Abb.2

Tab. 4

Anteil der großen Zellen in Prozent

	n	$\bar{x}$	S $\bar{x}$	Min	Max	p
Eigenes Kapillarblut	11	0.592	0.0966	0.098	1.287	
Normales Patientenblut	13	0.943	0.1623	0.015	1.389	
chron. myeloisches Blut	8	2.572	1.283	0.622	11.314	
akut myeloisches Blut	7	5.497	1.483	0.629	11.771	< 0.001
Normales Knochenmark	14	2.206	0.1784	1.161	3.394	
chron myeloisches Kno.mark	10	5.520	1.907	1.070	19.707	< 0.025
akut myeloisches Kno.mark	9	5.792	0.9137	1.146	8.653	< 0.001

1.3) Bestimmung des intrazellulären pH-Wertes.

Der intrazelluläre pH in den Granulozyten von normalen und chron. myeloischen Blutproben und in den mittelgroßen Zellen von normalen und chron. myeloischen Knochenmarksproben liegt im Mittel zwischen 7,6 und 7,7.

Die Granulozyten im akut myeloischen Blut und akut myeloischem Mark sind im Mittel saurer.

Der intrazelluläre pH der Lymphozyten liegt im Mittel in allen Gruppen unter dem der Granulozyten.

Das entspricht dem Befund bei dem Großteil der Einzelmessungen, wo die Lymphozytenpopulation stets etwas saurerer-unterhalb der Granulozytenpopulation liegt.

Bei allen Patientenproben liegt der mittlere intrazelluläre pH der Lymphozyten unter 7,5.

Im eigenen Kapillarblut liegt er im Mittel darüber.

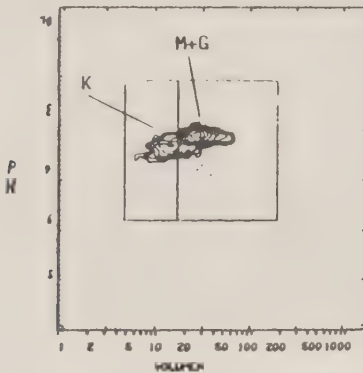
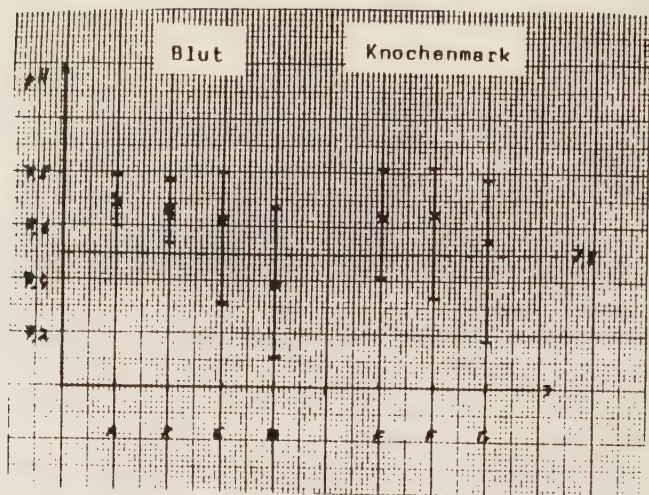


Abb. 7

Beispiel für die Darstellung "intrazelluläres pH" einer normalen Knochenmarksprobe. K= Blutlymphozyten bzw. kleine Zellen; M+G= Granulozyten + unreife Vorstufen bzw. mittelgroße und große Zellen.

a)



b)

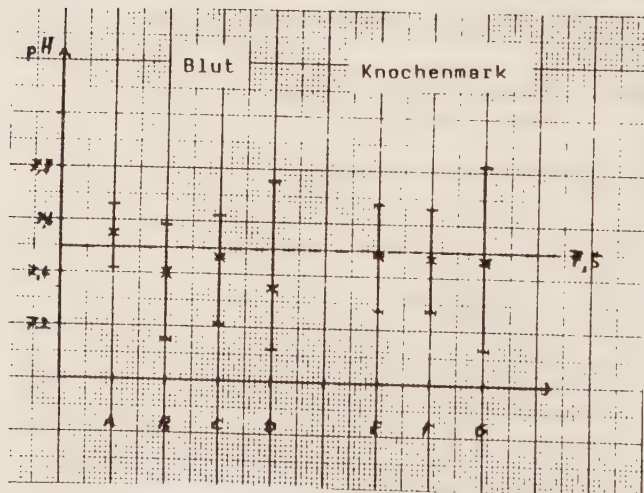


Abb. 8

Intrazelluläres pH von Lymphozyten bzw. kleinen Zellen (a) und Granulozyten mit unreifen Vorstufen bzw. mittelgroße und große Zellen (b) : Verteilung bei den verschiedenen Diagnosegruppen. A= Eigenblut, B= normales Patientenblut, C= linksverschobens Pat.blut, D= akut. myeloisches Pat.blut, E= normales Knochenmark, F= chron. myeloisches Knochenmark, G= akut. myeloisches Kn.

Balken wie in Abb.2

Tab. 5

Intrazelluläres pH der kleinen Zellen (Lymphozyten)

	n	$\bar{x}$	$S\bar{x}$	Min	Max
Eigenes Kapillarblut	11	7.55	.027	7.42	7.66
Normales Patientenblut	13	7.40	.033	7.15	7.59
chron. myeloisches Blut	7	7.46	.047	7.21	7.62
akut myeloisches Blut	7	7.35	.099	7.12	7.76
Normales Knochenmark	14	7.49	.032	7.27	7.67
chron myeloisches Kno.mark	9	7.47	.047	7.27	7.66
akut myeloisches Kno.mark	9	7.46	.065	7.13	7.82

Tab. 6

Intrazelluläres pH der mittelgroßen und großen Zellen (Granulozyten und unreifen Zellen)

	n	$\bar{x}$	$S\bar{x}$	Min	Max
Eigenes Kapillarblut	11	7.69	.016	7.60	7.79
Normales Patientenblut	13	7.67	.018	7.54	7.77
chron. myeloisches Blut	7	7.62	.064	7.31	7.80
akut myeloisches Blut	7	7.39	.096	7.12	7.67
Normales Knochenmark	14	7.63	.036	7.41	7.81
chron myeloisches Kno.mark	9	7.64	.057	7.34	7.82
akut myeloisches Kno.mark	9	7.55	.088	7.18	7.96

1.4) Erfassung des Anteils proliferierender Zellen.

Die Auftragung "Volumen gegen DNA" (Abb 9) erlaubt die Beurteilung der Proliferation des Knochenmarks und die Feststellung von DNA-Aneuploidie.

Der Anteil proliferierender mittelgroßer u. großer Zellen bei den normalen Blutproben stets unter 6% (Tab 7).

Bei dem normalen Knochenmark liegen ebenfalls 8 von 11 Proben in einem ähnlich niedrigen Bereich (unter 5%).

3 Proben von normalem Knochenmark liegen in einem mittelhohen Bereich von 7% bis 20% Anteil proliferierender mittelgroßer und großer Zellen.

Auch das leukämische Knochenmark hat Proliferationsraten im unteren und mittleren Bereich.

Darüberhinaus gibt es aber auch Proben mit einem Anteil proliferierender Zellen von über 30%, bis über 50%. Bei chron. myeloischem Knochenmark ist das bei 3 von 9 Proben der Fall (33%), bei akut myeloischem Mark in 2 von 7 Fällen (29%).

Auch bei den leukämischen Blutproben liegen 2 von 9 Proben in diesem hohen Bereich (22%).

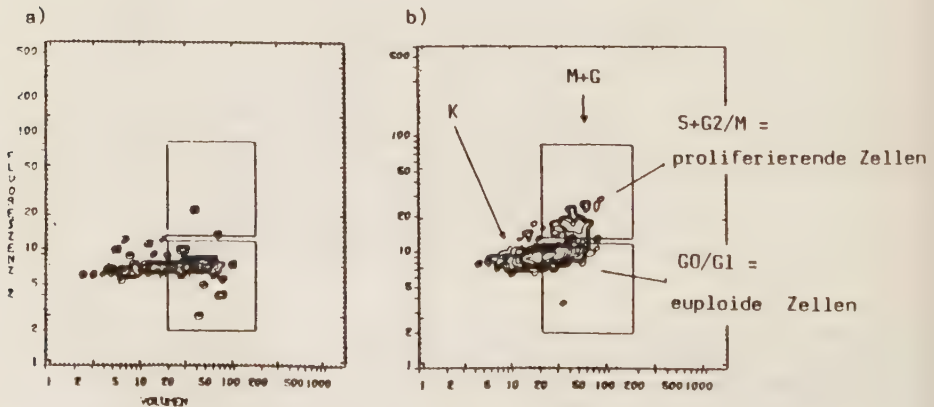


Abb. 9

Beispiel für eine normale Knochenmarkspröbe mit geringem Anteil (a) und für eine akut. myeloische Knochenmarkspröbe (b) mit hohem Anteil proliferierender Zellen im Bereich der mittelgroßen und großen Zellen.

K = kleine Zellen (im Blut Lymphozyten)

M+G = mittelgroße und große Zellen (im Blut Granulozyten und unreife Vorstufen)

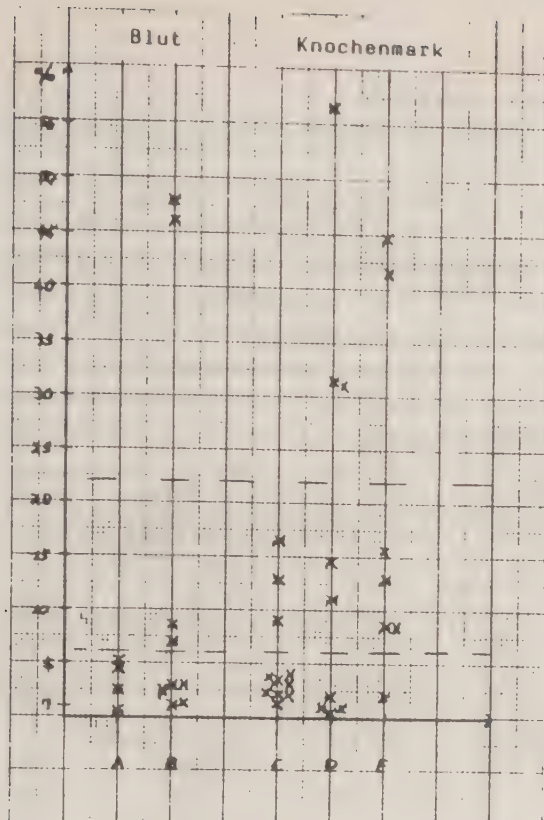


Abb. 10

Prozentualer Anteil an proliferierenden mittelgroßen und großen Zellen: Verteilung bei den verschiedenen Diagnosegruppen: A= Eigenblut + normales Patientenblut, B= linkerverschobenes Pat.blut + akut. myeloisches Pat.blut, C= normales Knochenmark, D= chron. myeloisches Knochenmark, E= akut. myeloisches Kn.

Tab. 7

Anteil proliferierender mittelgroßer und großer Zellen.

	n	$\bar{x}$	S $\bar{x}$	Min	Max
Eigenes Kapillarblut	4	3.492	1.183	0.000	5.263
Normales Patientenblut					
chron. myeloisches Blut					
akut myeloisches Blut	9	13.133	6.476	0.900	46.179
• Normales Knochenmark	11	5.509	1.563	1.351	16.741
chron myeloisches Kno.mark	9	16.716	7.044	0.392	56.521
akut myeloisches Kno.mark	7	19.159	6.432	2.000	44.816

2.) AO-DIOC6-Färbung

Die Auszeichnung von Zellvolumen gegen Fluoreszenz ergibt eine Auftrennung der Zelleprobe in einen Thrombozyten-, Erythrozyten-, Lymphozyten-, Granulozyten- und Partikelhaufen (Abb 11). Die Erythrozyten werden bei dieser Messung elektronisch nur zu einem Teil registriert damit die anderen Zellgruppen deutlicher hervortreten. Bei der Ausrechnung der Prozent-Häufigkeit der einzelnen Populationen ist dies zu berücksichtigen. Ein direkter Vergleich mit dem Anteil einer gewissen Zellspezies im Blutausstrich ist daher nicht gegeben.

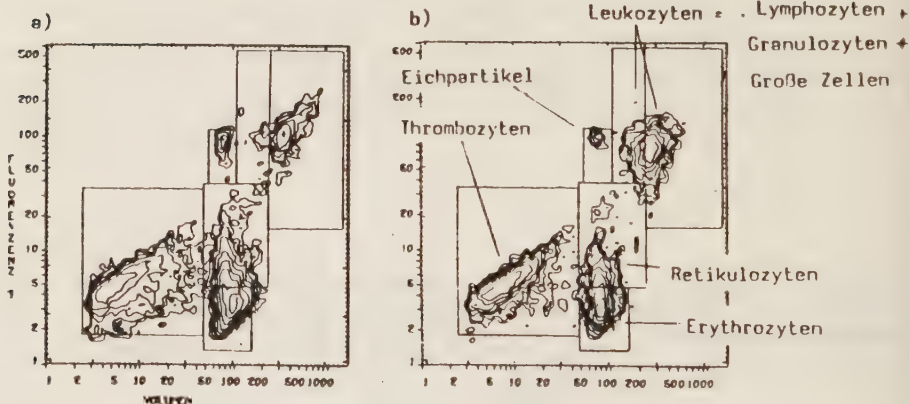


Abb. 11

Beispiel für die Verteilung der Zellpopulationen bei der AO/DIOC6-Färbung anhand einer durchschnittlichen normalen Knochenmarksprobe und einer leukozytenreichen linksverschobenen Blutprobe b).

2.1) Erfassung des Anteils der Leukozyten.

Der Anteil der Leukozyten ist bei normalem Patientenblut und bei eigenem Kapillarblut in etwa gleich: unter 2% Häufigkeit.

Bei normalem Knochenmark liegt der Leukozytenanteil aller Proben unter 5% Häufigkeit.

Bei leukämischem Blut und leukämischem Knochenmark liegen ebenfalls Leukozytenanteile in diesem Bereich.

Darüberhinaus gibt es auch Proben mit erheblich höheren Anteilen bis über 20% Häufigkeit.

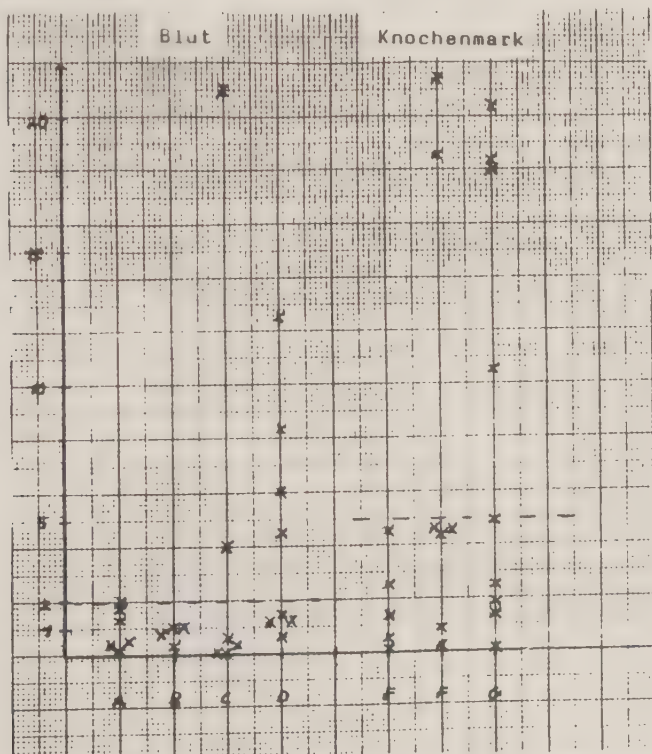


Abb. 12

Prozentuale Häufigkeit der Leukozyten: Verteilung bei den verschiedenen Diagnosegruppen. A= Eigenblut, B= normales Patientenblut, C= linksverschiebendes Pat.blut, D= akut. myeloisches Pat.blut, E= normales Knochenmark, F= chron. myeloisches Knochenmark, G= akut. myeloisches Knochenmark.

Tab. 8
Anteil der Leukozyten in Prozent

	n	$\bar{x}$	$S\bar{x}$	Min	Max	p
Eigenes Kapillarblut	6	1.014	0.2934	0.229	1.935	
Normales Patientenblut	4	0.917	0.2340	0.304	1.396	
chron. myeloisches Blut	6	4.280	3.405	0.100	21.004	
akut myeloisches Blut	8	4.462	1.529	0.668	12.551	< 0.05
Normales Knochenmark	5	1.797	0.7780	0.509	4.519	
chron myeloisches Kno.mark	7	7.806	6.356	0.250	21.558	
akut myeloisches Kno.mark	9	8.656	4.555	0.143	20.472	

2.2) Erfassung des Anteils der Thrombozyten.

Der Anteil der Thrombozyten in den einzelnen Gruppen streut von ca. 5% Häufigkeit bis etwa 30% Häufigkeit.

Eine größere Streuung und höhere Spitzenwerte finden sich beim chronisch leukämischen Patientenblut.

Beim chronisch leukämischen Knochenmark kommen nur Thrombozytenanteile von über 15% Häufigkeit vor.

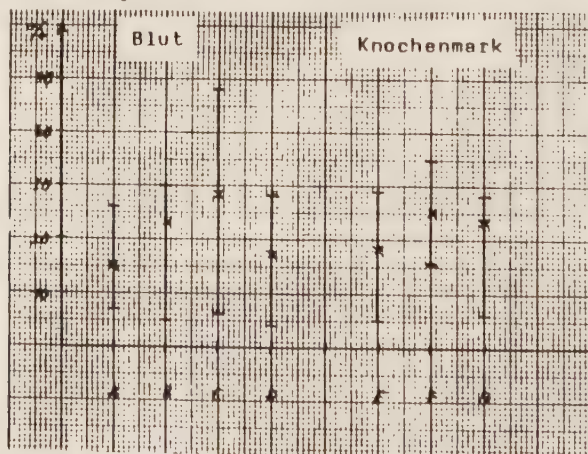


Abb. 13
Prozentualer Anteil der Thrombozyten: Verteilung bei den verschiedenen Diagnosegruppen. A= Eigenblut, B= normales Patientenblut, C= linksverschobenes Pat.blut, D= akut. myeloisches Pat.blut, E= normales Knochenmark, F= chron. myeloisches Knochenmark, G= akut. myeloisches Kn.

Balken wie in Abb.2

Tab. 9

Anteil der Thrombozyten in Prozent

	n	$\bar{x}$	$S\bar{x}$	Min	Max
Eigenes Kapillarblut	6	14.719	2.387	6.869	26.074
Normales Patientenblut	4	22.716	6.041	4.765	29.757
chron. myeloisches Blut	6	28.645	5.975	6.623	47.854
akut myeloisches Blut	8	16.723	2.638	4.045	28.273
Normales Knochenmark	5	17.853	6.290	5.460	29.357
chron myeloisches Kno.mark	7	24.840	3.013	15.362	35.904
akut myeloisches Kno.mark	9	22.729	3.582	6.042	28.160

2.3) Erfassung des Rot/Gelb-Fluoreszenzquotienten der Zellen.

In dieser Messung werden einerseits die Blutlymphozyten bzw. die kleinen Knochenmarkszellen betrachtet und andererseits die Blutgranulozyten bzw. die mittelgroßen und großen Zellen des Knochenmarks. Die angegebenen Werte entsprechen dem Verhältnis der Rot- zu Gelbfluoreszenz. Je höher der Wert ist, desto rötlicher ist die Fluoreszenz der Zelle.

Der Rot/Gelb-Quotient bei Granulozyten von normalen und chronisch leukämischen Blutproben sowie der mittelgroßen und großen Zellen von normalen und chronisch leukämischen Knochenmarksproben liegt meist deutlich über einem Wert von .02 .

Hingegen liegen die analogen Werte bei akut myeloischem Blut und akut myeloischem Knochenmark meist unter diesem Wert.

Bei den Blutlymphozyten und kleinen Knochenmarkszellen ergab sich bei fast allen Messungen ein Rot/Gelb-quotient von unter .02 .

Die Streuung der Werte bei Lymphozyten ist gering.

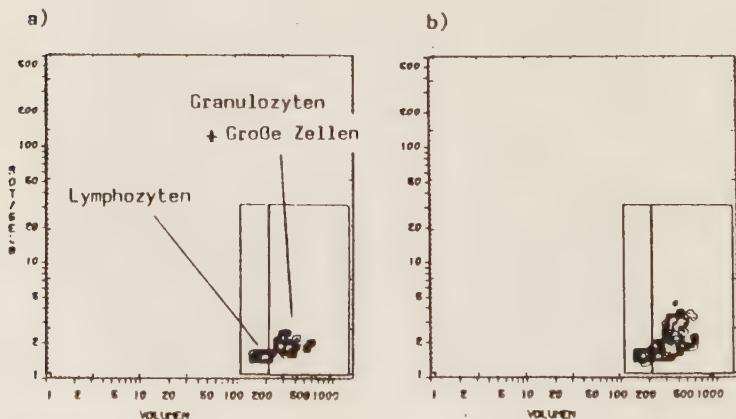


Abb. 14

Beispiel für die Darstellung "Rot/Gelb-Quotient" anhand einer normalen Blutprobe mit niedrigen Werten (a) und einer normalen Blutprobe mit normalen Werten (b) für die Granulozyten mit unreifen Vorstufen bzw. mittelgroße mit großen Zellen.

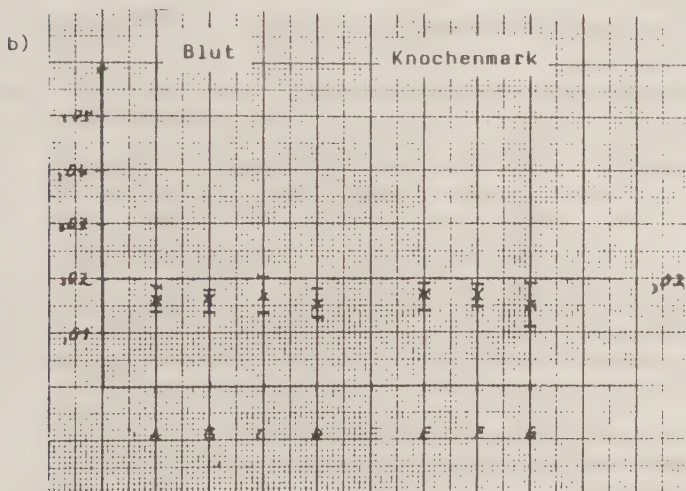
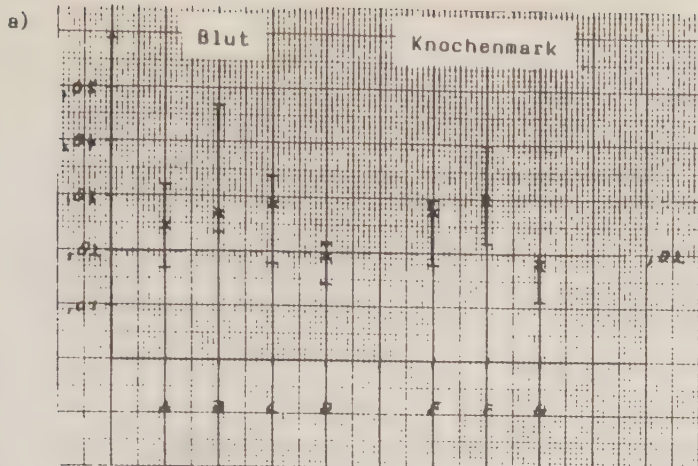


Abb. 15
 Rot/Gelb-Verhältnismerte bei Lymphozyten bzw. kleinen Zellen a) und Granulozyten mit unreifen Vorstufen bzw. mittelgroße mit großen Zellen b) : Verteilung bei den verschiedenen Diagnosegruppen. A= Eigenblut, B= normales Patientenblut, C= linkaverschobens Pat.blut, D= akut. myeloisches Pat.blut, E= normales Knochenmark, F= chron. myeloisches Knochenmark, G= akut. myeloisches Kn.

Tab. 10

Rot/Gelb-Quotient der kleinen Zellen

	n	$\bar{x}$	$S\bar{x}$	Min	Max
Eigenes Kapillarblut	6	0.0160	4.96 E-4	0.0147	0.0183
Normales Patientenblut	4	0.0166	6.57 E-4	0.0144	0.0175
chron. myeloisches Blut	6	0.0171	9.48 E-4	0.0139	0.0204
akut myeloisches Blut	8	0.0154	5.75 E-4	0.0133	0.0182
Normales Knochenmark	5	0.0171	8.56 E-4	0.0143	0.0188
chron myeloisches Kno.mar	7	0.0170	4.45 E-4	0.0154	0.0185
akut myeloisches Kno.mark	9	0.0151	8.89 E-4	0.0117	0.0189

Tab. 11

Rot/Gelb-Quotient der mittelgroßen und großen Zellen

	n	$\bar{x}$	$S\bar{x}$	Min	Max
Eigenes Kapillarblut	6	0.0245	2.40 E-3	0.0168	0.0324
Normales Patientenblut	4	0.0276	5.21 E-3	0.0237	0.0477
chron. myeloisches Blut	6	0.0295	5.14 E-3	0.0181	0.0341
akut myeloisches Blut	8	0.0192	1.18 E-3	0.0145	0.0216
Normales Knochenmark	5	0.0278	2.23 E-3	0.0178	0.0294
chron myeloisches Kno.mar	7	0.0309	2.34 E-3	0.0225	0.0409
akut myeloisches Kno.mark	9	0.0178	1.75 E-3	0.0118	0.02071

DISKUSSION

=====

Zur automatisierten Differenzierung von Blutproben stehen heute im Wesentlichen 2 Systeme zur Verfügung:

- a) das System der Computer-Bildanalyse dh. automatisierten morphologischen Auswertung.
- b) die verschiedenen Anwendungsmöglichkeiten der Durchflußzytometrie.

Bildanalyse (1,57,58,62,63).

Ein Blutaustrich wird hergestellt und nach den üblichen Methoden gefärbt. Die Auswertung erfolgt unter dem Mikroskop nach morphologischen Kriterien. Auswerter ist jedoch kein Mensch, sondern, ein Computerprogramm, das die auszuwertenden Bilder von einer Fernsehkamera erhält. Die Vorteile gegenüber den durchflußzytometrischen Systemen liegen auf dem Gebiet der Differenzierung des roten Blutbildes, das sich den zytochemischen Ansätzen der Durchflußzytometer weitgehend entzieht. Ein weiterer Vorteil liegt in der einfachen Möglichkeit der Nachdifferenzierung "von Hand", die bei allen unklaren Fällen bei automatisierten Systemen obligat ist.

Die Nachteile der Computer-Bildanalyse liegen zum Einen in dem nicht unerheblichen Zeitaufwand begründet, der für Ausstrich, Färbung und Differenzierung nötig ist. Außerdem ist der Computer gegen Unregelmäßigkeiten in der Färbung empfindlich, die trotz guter Färbetechnik vorkommen können. Unterlegen ist die Computer-Bildanalyse der Durchflußzytometrie auch in der Präzision der Methode. Es werden meist nicht mehr als 100 bis 500 Zellen ausgewertet im Gegensatz zu mehreren Tausenden bei der Durchflußzytometrie.

Durchflußzytometrie (31,34,47,60,64,65).

Durchflußzytometer werden heute vorwiegend als Blutzellzählgeräte genutzt. Für die Zählung der Erythrozyten und der Leukozyten haben sie das Mikroskop und die Zählkammer fast völlig verdrängt (26,28).

Die Zellen fließen hintereinander durch ein elektrisches (23,29,61) oder optisches (24,25) Registrierfeld. Erythrozyten und Leukozyten (nach Lyse der Erythrozyten) einer Blutprobe können sehr einfach und schnell auf diese Weise gezählt werden (26,28).

In der vorliegenden Studie war die Zellzählung Grundlage für die computertechnische Berechnung mehrerer Subpopulationen einer Blut- oder Knochenmarksprobe.

Das Zellvolumen wird in den meisten Durchflußzytometern entweder elektrisch (Coulter-Prinzip, 29) oder optisch (Vorwärtslichtstreuung bei Eintritt der Zelle in einen Lichtstrahl, 24) gemessen. In der vorliegenden Studie wurde die Coulter-Methode verwendet. Sie bietet die genauere Volumenmessung, kann aber bei Zellsortern nur mit Schwierigkeiten eingesetzt werden.

Die meisten Durchflußzytometer enthalten heute auch einen optischen Teil. In ihm können gefärbte Zellen beim Eintritt in einen Lichtstrahl anhand ihrer Färbung vermessen werden. Bei Fluoreszenzsystemen wird das, von fluoreszenten Farbstoffen emittierte, Licht vor dunklem Hintergrund gemessen. Bei den Absorptionssystemen wird die Absorption der gefärbten Zelle vor einem hellen Hintergrund gemessen. Die Fluoreszenzmessung wurde in der vorliegenden Studie verwendet. Sie ergibt technisch bessere Signale. Es können mehrere Fluochrome gleichzeitig verwendet werden.

Die Kombination der zytochemischen Meßmethode mit der elektrischen Größenmessung ist die zur Zeit leistungsfähigste Anwendung der Durchflußzytometrie zur Differenzierung von Blutzellen. Sie ist Grundlage der vorliegenden Studie.

Zytochemischen Färbungen in der durchfluß-zytometrischen Blutdifferenzierung .

Die in der Durchflußzytometrie benutzten zytochemischen Färbungen lassen sich in zwei Gruppen unterteilen. Zum einen in die Fluoreszenz-Farbstoffe, die auch in der vorliegenden Studie verwendet wurden und in die Absorptions-Farbstoffe. Die meisten zytochemischen Färbungen werden verwendet um das weiße Blutbild zu differenzieren (2,3,15,52,54,55,58,68).

Die klassische, mikroskopisch-morphologische Blut- und Knochenmarksdiagnostik.

In der Zellzählung von Erythrozyten und Leukozyten ist die mikroskopische Auszählung mittels Zählkammern heute weitgehend von den Durchflußzytometern verdrängt worden. Retikulozyten werden auf einem gefärbten Blutausschlag gezählt und in Promille d.h. pro 1000 Erythrozyten angegeben.

Die Differenzierung der Leukozyten erfolgt im Blutausschlag der nach der "panoptischen" Färbung nach May-Grunwald-Giemsa gefärbt wurde. Ausgezählt werden 100 Leukozyten oder ein Vielfaches davon. Unterschieden werden neutrophile, eosinophile und basophile Granulozyten, große und kleine Lymphozyten, Monozyten und unreife Vorläuferzellen. Außerdem wird meist das rote Blutbild morphologisch bewertet.

Für alle hier genannten Untersuchungen gibt es Ansätze der Automatisierung mittels Durchflußzytometrie oder Computer-Bildanalyse (s.o.).

Zur mikroskopischen Differenzierung von Knochenmark wird das aspirierte Knochenmark wie ein Differenzialblutbild ausgestrichen und gefärbt. Ausgezählt werden 100 Zellen der roten und weißen Reihe oder ein Vielfaches davon. Zusätzlich zu den Zellen die im Blutbild vorkommen können hier unterschieden werden: Myeloblasten, Promyelozyten, Myelozyten, Metamyelozyten und Stabkernige; ferner Proerythroblasten, Erythroblasten und Normoblasten und schließlich die Plasmazellen. Außerdem wird auf Megakaryozyten und pathologische Zellen wie z.B. Megaloblasten geachtet.

Die Differenzierung eines Knochenmarksausschlages ist eine diagnostische Methode die weitreichende Konsequenzen nach sich ziehen kann. Sie erfordert beträchtliche Erfahrung. Zur Zeit existiert kein automatisches System das diese Aufgabe übernehmen kann. Mit der vorliegenden Studie wurde ein Versuch in diese Richtung unternommen.

Ergebnisse der ADB/PJ-Färbung.

Die zytochemische Fluoreszenzfärbung mit ADB ist eine bewährte Methode zur Untersuchung von Zellen auf Esteraseaktivität und intrazellulären pH (9). Durch gleichzeitige Färbung mit PJ ist bei der graphischen Darstellung in einem Diagramm eine Trennung von toten und lebenden Zellen möglich. Die zytochemische Fluoreszenzfärbung mit PJ ist eine etablierte Methode zur fluoreszenzoptischen Darstellung der DNA und zur Untersuchung auf Aneuploidie (43).

In der vorliegenden Studie wurde eine gleichzeitige Färbung mit beiden Farbstoffen vorgenommen. Zusätzlich zu den erwähnten Parametern (mit Ausnahme der Esteraseaktivitätsbestimmung) wurde die Zellvolumenmessung dazu benutzt zwischen Granulozyten, Lymphozyten und großen Zellen zu differenzieren und diese Zellpopulationen zahlenmäßig zu erfassen. Zur Richtigkeit dieser Methode im Vergleich zur morphologischen Auszählung gibt es noch keine Studien. Die Trennung zwischen Lymphozyten und Granulozyten erfolgte aufgrund von Volumen und Färbeeigenschaften der Zellen. Die beiden Populationen stellen sich im Diagramm getrennt dar. Zwischen den beiden "Bergen" der Zellpopulationen liegt ein, meist deutliches, Tal, in welches die Trennlinie fällt.

Die computertechnische Abtrennung der Granulozyten von den großen Zellen gestaltet sich schwieriger da hier kein "Tal" vorliegt. Die großen Zellen gehen aus den Granulozyten zwar meist mit einer "Schulter" aber doch stetig fallend hervor. Es wurde daher die Trennlinie zu den Granulozyten stets in einem festen Abstand zu dem Häufigkeitsgipfel, dem "Berggipfel", der Granulozyten gezogen.

Die Zellpopulation der großen Zellen setzt sich aus mehreren, morphologisch unterscheidbaren, Zellarten zusammen. Zu diesen gehören die Vorstufen der roten Reihe: Proerythroblasten und Erythroblasten, der weißen Reihe: Promyelozyten, Myelozyten und Metamyelozyten und schließlich den Monozyten. Die deutlich größten Zellen sind die Promyelozyten (20-25 Mikrometer), die anderen genannten Zellen liegen in der Größe zwischen den Granulozyten (ca. 15 Mikrometer) und den Promyelozyten.

Da in keinem der untersuchten Blut- und Knochenmarksproben morphologisch eine Monozytose vorhanden war, dürfen die "großen Zellen" als Abbild hauptsächlich der Vorstufen der roten und weißen Reihe angenommen werden. Myeloblasten sind kaum größer als Granulozyten. Es ist daher unklar, warum bei Blastenblut und Blastenknochenmark die Zahl der großen Zellen erhöht ist. Die vermehrte Bildung größerer Vorstufenzellen bzw. die vermehrte Ausschwemmung der reiferen Zellen könnte diesen Befund erklären. Eventuell ist eine Ausschwemmung anderer Vorstufen bei gestörter Blut-Knochenmarksschranke im leukämisch durchgesetzten Knochenmark der Grund.

Während die biochemischen Grundlagen der unterschiedlichen Anfärbbarkeit von toten und lebenden Zellen bei der ADB/PJ-Färbung gut bekannt sind, gibt es über die Aussage der PJ-Anfärbbarkeit mehrere Deutungsmöglichkeiten. Entweder waren die Zellen bereits im Organismus vor Entnahme tot oder sie starben durch die methodische Aufarbeitung. Im ersten Fall weist die erhöhte Sterblichkeit einer Zellpopulation auf eine kürzere Lebenszeit per se hin oder auf ein, zB. durch Zytostase, induziertes Sterben dieser Zellgruppe. Im anderen Fall deutet eine erhöhte Zahl toter Zellen auf eine größere physiko-chemische Vulnerabilität dieser Population hin.

Die durchflußzytometrische Erfassung von Aneuploidie über die PJ-Färbung ist eine bewährte Methode. Sie ist geeignet zur Erfassung maligner Zellen bei Leukämien (14,18,38,50) und mehreren anderen Krebsarten (37,39,40,41,42). Für Leukämien der verschiedenen Subtypen werden in der Literatur unterschiedliche Aneuploidie-Häufigkeiten genannt. Die in der vorliegenden Studie ermittelten Werte von 22% bis 33% liegen in einem mittleren Bereich.

Die AO/DIOC6-Färbung.

Die AO-Färbung ermöglicht die Messung von intrazellulärer DNA und RNA (12,27,48,49,51,52,54,55). Die DIOC6-Färbung gibt Aufschluß über das Transmembranpotential (11). In der vorliegenden Studie wurde die Kombination dieser Färbungen zur Differenzierung und Zählung folgender Blut- und Knochenmarkszellen benutzt: Leukozyten, Erythrozyten, Retikulozyten und Thrombozyten. Dieser Ansatz ist in der Literatur beschrieben (12), Studien über die Richtigkeit dieser Methode im Vergleich zur morphologischen Auszählung fehlen jedoch. Der direkte

Vergleich ist schwierig, weil die vorgestellte durchflußzytometrische Methode Prozentanteile von der Gesamtheit aller gemessenen Zellen liefert. In Relation zu der Zahl der Eichpartikel ist eine absolute Konzentration jedoch zu errechnen. Außerdem wurde die elektronische Registrierung der Erythrozyten bewußt beschnitten, um die Darstellung der anderen Zellgruppen zu verbessern. Die Auswertung der Zellzahlen in den einzelnen Populationen beschränkt sich in dieser Studie auf einen Vergleich der einzelnen Diagnosegruppen untereinander.

Bei der gleichzeitigen Färbung von Zellen mit AO und DIOC6 ist es nicht mehr möglich den gemessenen Fluoreszenzen ein eindeutiges strukturelles oder funktionelles Substrat zuzuordnen. Somit ist auch unklar welche biochemische Aussage in dem Wert des Rot/Gelb-Fluoreszenzquotienten enthalten ist. Die Unterschiedlichen Werte für Granulozyten und Lymphozyten sind jedoch deutlich, Ebenso deutlich sind die niedrigeren Werte für Granulozyten in blastenreichen Blut- und Knochenmarksproben.

Die Untersuchung hat insgesamt gezeigt, daß Unterschiede in Volumen, pH, Esterase, RNS und DNS bei Blut- und Knochenmarksproben von normalen gegenüber leukämischen Patienten gemessen werden können. Es scheint aussichtsreich die Resultate dieser Messung in eine selbstlernende Datenbank einzugeben (72,73) und ähnlich wie dies bei anderen Krebsarten gezeigt wurde zur Diagnostik mit heranzuziehen. Dies ist auch deshalb von Interesse, weil die automatisierte Auswertung der Resultate solcher Multifunktionsmessungen in anderen Fällen prognostische Informationen enthielt, was für den einzelnen Patienten therapeutische Konsequenzen haben kann (73,74).

ZUSAMMENFASSUNG

=====

Es wird eine Methode zur durchflußzytometrischen Differenzierung und Zellzählung von Blut- und Knochenmarksproben vorgestellt. Es wurden zwei Fluoreszenzfärbungen verwendet und eine geeignete Computerauswertung dazu entwickelt. Die ADB/PI - Messung erfaßt gleichzeitig den intrazellulären pH-Wert und die Esteraseaktivität der lebenden Zellen sowie die DNS-Verteilung der toten Zellen. Bei der AO/D10C6 - Messung wird die DNS und RNS in lebenden und toten Zellen dargestellt. Die Messungen wurden an eigene Blutproben sowie normalen und leukämischen Blut- und Knochenmarksproben von Patienten durchgeführt. Die Auswertung erfaßte 10 Parameter von jeder gemessenen Probe.

Folgende Parameter blieben bei Lagerung auf Eis über zwei Stunden unbeeinflusst : Gesamtleukozytenzahl, Zahl der Granulozyten, Lymphozyten, Vorstufen der roten und weißen Reihe (große Zellen), der Anteil toter Leukozyten und der intrazelluläre pH-Wert der Granulozyten.

Folgende Parameter änderten sich: der intrazelluläre pH-Wert der Lymphozyten fällt ab.

Keiner der 10 untersuchten Parameter beweist für sich alleine, daß die gemessene Probe normal oder pathologisch ist. Folgende Parameter zeigen eine pathologische Probe an wenn sie höhere Werte annehmen als sie von Normalproben erreicht werden: Gesamtleukozytenzahl, Anzahl von Vorstufen (großen Zellen), Anteil toter Leukozyten und Anteil polyploider Granulozyten. Folgende Parameter sind bei pathologischen Proben nur tendenziell verändert: Zahl der Granulozyten (erhöht) und Zahl der Lymphozyten (verringert).

Eine im Diagramm getrennte Darstellung von stabkernigen Granulozyten und Metamyelozyten einerseits (in linksverschobenem Blut bei chronisch

myeloischer Leukämie) und Myeloblasten andererseits (zB bei akuter myeloischer Leukämie) gelingt mit der vorgestellten Methode nicht.

Eine Unterscheidung zwischen diesen beiden Diagnosen ist dennoch anhand folgender Parameter möglich: Die Anzahl toter Zellen ist bei Blastenblut erheblich höher als bei linksverschobenem Blut. Der intrazelluläre pH-Wert von Granulozyten einschließlich Vorstufen (großer Zellen) ist bei Blastenblut saurer als bei linksverschobenem Blut, welches einen pH-Wert im Mittel wie normales Blut hat. Das Verhältnis der Rot- zur Gelbfluoreszenz bei der AO/DIOC6-Färbung ist bei Granulozyten einschließlich Vorstufen in Blastenblut niedriger als in linksverschobenem Blut, welches im Mittel einen Wert etwa wie normales Blut hat. Mit denselben Parametern läßt sich auch zwischen linksverschobenem und blastenreichen Knochenmark unterscheiden.

Deutliche funktionell-biochemische Unterschiede ergeben sich beim Vergleich von Granulozyten und Lymphozyten. Bei fast allen gemessenen Einzelproben sind die Lymphozyten saurer als die Granulozyten. Ebenfalls deutliche Unterschiede ergaben sich bei dem Rot/Gelb-Quotienten der AO/DIOC6-Färbung. Dieser Quotient ist bei Lymphozyten in allen, bis auf die blastenreichen, Proben deutlich niedriger als bei den Granulozyten.

Diese nicht-morphologischen Unterscheidungskriterien zwischen Lymphozyten und Granulozyten können bei der Zuordnung von akuten undifferenzierten (dh. morphologisch nicht differenzierbaren) Leukämien eine Hilfe sein.

Es besteht die Aussicht, durch eine gleichzeitige, multifaktorielle Analyse aller gemessenen Zelleigenschaften, die gemessenen Veränderungen für eine automatische Wertung der Zellproben einzusetzen.

LITERATURVERZEICHNIS

=====

- 1 Neumann,E.: XXII.Mechanisierung im hämatologischen Laboratorium.
med. 7,A+B: 123 (1983)
- 2 Pralle,H.:Zum Stand der mechanischen Leukozytendifferenzierung. mta
1: 941-943 (1986)
- 3 Wardlaw,S., Rathbone,R., McPhedran,P. : An instrument for white
blood cell subclassification. Clinical Products Review 4/6: 11-20
(1985)
- 4 Scholda,G., Kovacs,J., Lanschützer,H., Unger,W., Bayer,PM. :
Aussagekraft und klinische Interpretation der Volumenverteil-
ungskurven der roten Blutzellen. Lab.med. 7: 333-335 (1983)
- 5 Lanschützer,H., Kovacs,J., Scholda,G., Unger,W., Bayer,PM. :
Aussagekraft und klinischen Interpretation der Volumenverteil-
ungskurven der weißen Blutzellen. Lab.med. 7: 336-338 (1983)
- 6 Reheis,G., Bayer,PM. :Aussagekraft und klinische Interpretation der
Thrombozyten-Volumenverteilungskurven. Lab.med. 7,339-341 (1983)
- 7 Werner,P. :Prinzip und Durchführung hämatologischer Messungen am
Beispiel der 5 wichtigsten Parameter. mta-journal 3: 98-100 (1980)
- 8 Maubach,PA., Emmerich,B., Rastetter,J.: Mechanisierte
Differenzierung von Blutzellen bei Diagnose und Verlaufskontrollen
von Leukämien - Vorteile und Grenzen. Lab.med. 7: 197-201 (1983)
- 9 Valet,G., Raffael,A., Moroder,L., Wünsch,E., Ruhenstroth-Bauer,G. :
Fast Intracellular pH Determination in Single Cells by Flow-
Cytometrie. Naturwissenschaften 68: 265 (1981)
- 10 Malin-Berdel,J., Valet,G.: Flow Cytometric Determination of
Esterase and Phosphatase Activities and Kinetics in Hematopoietic
Cells with Fluorogenic Substrates. Cytometrie 1: 222-228 (1980)
- 11 Valet,G., Nerl,C.: Early Transmembrane Potential Changes of
Lymphocyte Culters as Detectet by Flow-Cytometry.
Naturwissenschaften 69: 292 (1982)
- 12 Valet,G.: A New Method for Fast Blood Cell Counting and Partial
Differentiation by Flow Cytmetry. Blut 49: 83 (1984)
- 13 Valet,G., Raffael,A., Warnecke,HH., Wirsching,R.: Stellenwert der
Durchflußcytometrie bei der Früherkennung maligner Erkrankungen.
Deutschhh-Sowjetisches Symposium über Gegenwartsfragen der Medizin,
Kiew (1982)

- 14 Look,I., Melvin,L., Williams,D., Brodeur,GM., Dahl,G., Kalwinsky,D., Murphy,S. Mauer,A.: Aneuploidy and Percentage of S-Phase Cells Determined by Flow Cytometry Correlate with Cell Phenotype in Childhood Acute Leukemia. *Blood* 60: 959 (1982)
- 15 Muselow,E., Farkas-Himsley,H.: Bacteriocin and Flow Cytometry in Laboratory Diagnosis of Leukemic Peripheral Blood Lymphocytes and Bone Marrow Cells. *Eur.J.Cancer Clin.Oncol.* 19: 163 (1983)
- 16 Janke,HJ., Rothbarth,PH., Vossen,J. Koper,G. Ploem,J.: Flow Cytometrie of Reticulocytes Applied to Clinical Hematology. *Blood* 61: 1091 (1983)
- 17 Dosik,G., Barlogie,B., Göhde,W., Johnston,D. Tekell,J., Drewinko,B.: Flow Cytometrie of DNA Content in Human Bone Marrow - a Critical Reappraisal. *Blood* 55: 734 (1980)
- 18 Holdrinet,RSG., Pennings,A., Egmond,J., Wessels,JMC., Haanen,C.: DNA Flow Cytometry of Blood and Bone Marrow in Chronic Myelogenous Leukemia. *Acta haemat.* 69: 98 (1983)
- 19 Diamond,L., Nathwani,B., Rappaport,H.: Flow Cytometry in the Diagnosis and Classification of malignant Lymphoma and Leukemia. *Cancer* 50: 1122 (1982)
- 20 Andreeff,M., Darzynkiewicz,Z., Sharpless,IK., Clarkson,BD., Melamed, MR.: Diskrimination of Human Leukemia Subtypes by Flow Cytometric Analysis of Cellular DNA and RNA. *Blood* 55: 282 (1980)
- 21 Beckers,N., Frentzel-Begmer,R.: Krebsatlas der BRD. Springer Verlag (1984) Berlin
- 22 Wagner,G., Becker,N.: Die Krebssterblichkeit in Mitteleuropa. *Deutsches Ärzteblatt* 79: 41 (1982)
- 23 Kühne,D.: Verfahren der hämatologischen Meß- und Zähltechnik-Impedanzmeßprinzip. *Lab.med.* 8: 409 (1984)
- 24 Kühne,D.: Verfahren der hämatologischen Meß- und Zähltechnik - Das Streulicht-Meßprinzip mit Laser. *Lab.med.* 8: 412 (1984)
- 25 Weber,R.: Verfahren der hämatologischen Meß- und Zähltechnik - Lichtoptisches Prinzip nach Technicon. *Lab.med.* 8: 416 (1984)
- 26 Jakschik,J.: Erfahrungen der Physikalisch-Technischen Bundesanstalt (PTB) mit hämatologischen Zähltechniken. *Lab.med.* 8: 420 (1984)
- 27 Zeile,G.: Durchflußzytometrische Charakterisierung leukämischer Blutproben mit einer Acridinorange-Schnellfärbung. *Lab.med.* 8: 424 (1984)
- 28 Sippach,E., Kühne,D., Ley,M., Schneider,W., Spaethe,R.: Untersuchungen hämatologischer Probanden unter standardisierten Bedingungen mit verschiedenen Meßverfahren. *Lab.med.* 8: 429 (1984)

- 28 Sippach,E., Kühne,D., Ley,M., Schneider,W., Spaethe,R.: Untersuchungen hämatologischer Probanden unter standardisierten Bedingungen mit verschiedenen Meßverfahren. Lab.med. 8: 429 (1984)
- 29 Coulter, WH., Means for counting particles suspended in a fluid. U.S.Patent No.2.656.508
- 30 Kachell,V., Glossner,E., Kordwig,E., Ruhenstroth-Bauer,G.: Fluvo-Metricell, a combined cell volume and cell fluorescence analyser. J.Histochem. Cytochem. 25: 804 (1977)
- 31 Kruth, H.S.: Flow cytometry : Rapid biochemical analysis of single cells. Analyt.Biochem. 125: 225 (1982)
- 32 Li,C.Y., Lam,D.W., Yam,L.T.: Esterases in human leukocytes. J.Histochem.Cytochem. 21: 1-12 (1973)
- 33 Valet,G., Ruessmann,L., Wirsching,R.: Automated flow cytometric identification of colo-rectal tumor cells by simultaneous DNA, CEA-antibody and cell voume measurements. J.Clin.Chem.Biochem. 22: 935 (1984)
- 34 Melamed, MR., Mullaney, PF., Mendelson ML.: Flow cytometry and sorting. Wiley, New York (1979).
- 35 Schmalz, F., Braunssteiner,H.: Cytochemische Darstellung von Esteraseaktivitäten in Blut- und Knochenmarkszellen. Klin.Wschr. 46: 642 (1968)
- 36 Visser, JWM., Jongeling, AAM., Tanke,HJ.: Intracellular pH-determination by fluorescence measurements. J.Histochem.Cytochem. 27: 32-35 (1979).
- 37 Barlogie,B., Drewinko,B., Schumann,J., Gohde,W., Dosik,G., Latreille,J., Johnston,DA., Freireich,EJ.: Cellular DNA content as a marker of neoplasia in man. Am.J.Med. 69: 195 (1980)
- 38 Barlogie,B., Hittleman,W., Spitzer,G., Trujillo JM., Hart,JS., Smallwood,L., Drewinko,B.: Correlation of DNA distribution abnormalities with cytogenic findings in human adult leukemia and lymphoma. Cancer Res. 37: 4400 (1977)
- 39 Diamond,LW., Braylan,RC.: Flow analysis of DNA content and cell size in non-Hodgkin's Lymphoma. Cancer Res. 40: 703 (1980)
- 40 Latreille,J., Barlogie,B., Dosik,G., Johnston,DA., Drewinko,B., Aexanian,R.: Cellular DNA content as a marker of human multiple myeloma. Blood 55: 403 (1980)
- 41 Bunn,PA., Whang-Peng,J., Carney,DN., Schlamm,ML., Knutsen,I., Gazdar,AF.: DNA content analysis in mycosis fungoides and Sezary syndrome. J.Clin.Invest. 65: 1440 (1980)

- 42 Barlogie,B., Göhde,W., Johnston,DA., Smallwood,L., Schumann,J., Drewinko,B., Freireich,EJ.: Determination of ploidy and proliferative characteristics of human solid tumors by pulse cytometry. *Cancer Res.* 38: 3333 (1978)
- 43 Krishan,A.: Rapid flow cytofluorometric analysis of mammalian cell cycle by Propidium iodide staining. *J.Cell.Biol.* 66: 188, (1975)
- 44 Clarkson,BD., Dowling,MD., Gee,I., Cunningham,IB., Burchenal,JH.: Treatment of akute leukemia in adults. *Cancer* 36: 775 (1975)
- 45 Bennet, JM., Reed,CE.: Acute leukemia cytochemical profile: Diagnostic and clinical implications. *Blood Cells* 1: 101 (1975)
- 46 Bennet,M., Catovsky,D., Daniel,MT., Flandoin,G., Galton,DAG., Gralnik,HR., Sultan,C.: Proposals for the classification of acute leukemias. *Br.J.Hematol.* 33: 1976
- 47 Melamed,MR., Darzynkiewicz,Z., Traganos,F., Sharpless,I.: Cytology automatation by flow cytometry. *Cancer Res.* 37: 2806 (1977)
- 48 Darzynkiewicz,Z., Acridine orange as a molecular probe in studies of nucleic acids in situ, in: *Flow Cytometry and Sorting*. New York, Wiley, 1979, p285
- 49 Traganos,F., Darzynkiewicz,Z., Sharpless,I., Melamed,MR.: Simultaneous staining of ribonucleic and desoxyribonucleic acids in unfixed cells using acridine orange in a flow cytofluometric system. *J.Histochem.Cytochem.* 25: 46 (1977)
- 50 Andreeff,M., Drzykiewicz,Z., Sharpless,IK., Melamed,MR., Clarkson,B: Cytofluometric DNA and RNA measurements in the classification of human leukemias. *Blood* 50(Suppl.1): 181 (1977)
- 51 Lerman,LS.: the structure of the DNA-acridine complex. *Proc.Natl.Acad.Sci. USA* 49: 94 (1963)
- 52 Adams,LR., Kamentsky,LA.: Machine characterisation of human leucocytes by acridine orange fluorescence. *Acta Cytol.* 15: 89 (1971)
- 53 Adams,LR., Kamentsky,LA.: Fluorometric characterisation of six classes of human leukocytes. *Acta Cytol.* 18: 389 (1974)
- 54 Melamed,MR., Adams,LR., Traganos,F., Zimring,A., Kamentsky,LA.: Acridin orange metachromasia for characterisation of leucocytes in leukemia, lymphoma and other neoplasma. *Cancer* 29: 1361 (1972)
- 55 Melamed,MR., Adams,LR., Zimring,A., Murnic,JG., Mayer,K.: Preliminary evaluation of acridin orange as a vital stain for automated differential leucocyte counts. *Amer.J.Clin.Pathol.* 57: 95 (1972)

- 56 Loeffler, H.: Cytochemische Klassifizierung der akuten Leukosen. in: Chemo- und Immunotherapie der Leukosen und malignen Lymphome: S.92. Bohmann-Verlag, Wien, (1969)
- 57 Ingram, M., Norgren, P.E., Preston, K.: Advantages of topology as a basis for automated analysis of blood cell images. Ann.N.Y.Acad.Sci. 157: 257 (1969)
- 58 Bacus, J.W.: An automated classification of the peripheral blood leukocytes by means of digital image processing. Doctoral thesis, Department of Physiology, University of Illinois. (1971)
- 59 Fischel, R.: Histochemical study of peroxidases. Wien.Klin.Woch. 23: 1557 (1910)
- 60 Goldberg, A.F., Barka, T.: Acid phosphatase activity in human blood cells. Nature, 195: 297 (1962)
- 61 Crossland-Taylor, P.J.: A device for counting small particles in a fluid through a tube. Nature 171: 37 (1953)
- 62 Mansberg, H.P., Kusnetz, J.: Quantitative fluorescence microscopy: Fluorescent antibody automatic scanning techniques. J.Histochem.Cytochem. 14: 260 (1966)
- 63 Mendelson, M.L., Mayall, B.H., Prewett, J.M.S., Bostrom, R.C., Holcomb, W.G.: Digital transformations and computer analysis of mikroskopische images, images. in Advances in Optical and Electron Microscopy, Ed.V.E. Cossllett, N.Y., Academic Press: 77 (1968)
- 64 Catovsky, D., Greaves, M.R., Pain, C., Chechi, M., Janossy, G., Kay, H.E.M.: acid phosphatase reaction in acute lymphoblastic leukemia. Lancet 749 (1978)
- 65 Huhn, D., Thiel, E., Rodt, H.: Classification of normal and malignant lymphatic cells using acid phosphatase and acid esterase. Klin.Wochensh. 58: 65 (1980)
- 66 Huhn, D., Thiel, E., Rodt, H., Andreewa, P.: Cytochemistry and membran markers in acute lymphatic leukemia (ALL). Scand.J.Haematol. 26: 311 (1981)
- 67 Wintrobe, M.M.: The size and hemoglobin content of the erythrocyte. J.Lab.Clin.Med. 17: 899 (1932).
- 68 Cornbleet, J.: Spurious results from automated hematology cell counters. Lab.Medicine. 14: 509 (1983)
- 69 Barlogie, B., Raber, M.W., Schumann, J., Johnson, T.S., Drewinko, B., Swartzendruber, D.E., Göhde, W., Andreeff, M., Freireich, E.J.: Flow cytometry in clinical cancer research. Cancer Res. 43: 3982 (1983)

- 70 Wissenschaftliche Tabellen Geigy - Statistik. CIBA-GEIGY Limited, Basle, Switzerland (1984)
- 71 Dieter R.: Biomathematik. Edition Medizin, Weinheim (1983)
- 72 Valet,G., Warnecke,H.H., Kahle,H.: Automated Diagnosis of Malignant and Other Abnormal Cells by Flow-Cytometry Using the DIAGNOSI Program System. International Symposium on Clinical Cytometry and Histometry, Elmau (1986)
- 73 Valet,G., Kahle,H., Wirsching,H., Liewald,F., Demmel,N., Rübe,Ch., Warnecke,H.H.: Automatisierte Identifizierung und biochemische Charakterisierung menschlicher Tumorzellen mit Hilfe der Durchflußcytometrie. Aus : "Endokrin-aktive maligne Tumoren" von Engelhardt,D. Springer-Verlag Berlin (1987)
- 74 Valet,G., Rüssmann,L., Wirsching,H.: Automated Flow-Cytometric Identification of Colo-Rectal Tumor Cells by Simultaneous DNA, CEA-Antibody and Cell Volume Measurements. J.Clin.Chem.Clin.Biochem. 22 (1984)

DANKSAGUNG

=====

Mein Dank gilt Prof. Dr. med. G. Valet für die Überlassung des Themas und seine Bereitschaft, jederzeit alle auftauchenden Fragen zu beantworten.

Mein Dank gilt außerdem Herrn Dr. rer. nat. L. Rössmann, der mich durch ausführliche Beratungen im korrekten, wissenschaftlichen Arbeiten unterwies.

LEBENS LAUF

=====

Niels KREJCI

28.11.1961	geboren in Frankfurt am Main.
Eltern	Dr. med. habil. Kaj KREJCI, PD für Klin. Biochemie an der Poliklinik der Ludwig-Maximilians-Universität München. Dr. med. Jorinde KREJCI (geb. HOSENFELD)
1968-71	Volksschule Planegg (Überspringen der 2. Klasse)
1971-80	Kurt-Huber-Gymnasium Gräfelfing (neusprachlich)
1979-80	Kollegstufe : Leistungskurse Mathematik und Physik
27.06.1980	Abitur mit Gesamtnote 1,5
Mai.-Okt.1980	Bundeswehr Grundausbildung
Nov.1980	Beginn des Medizinstudiums an der Ludwig-Maximilian- Universität München
Aug.1982	Physikum (Ergebnis: 75,0%)
Aug.1983	1.Staatsexamen (Ergebnis: 81,4%)
Aug.1985	2.Staatsexamen (Ergebnis: 78,8%)
Okt.-Nov.1986	3.Staatsexamen (Ergebnis: mündlich: GUT schriftlich: 79,6%)
2.Dez.1986	Approbation als Arzt
Jan.-Dez.1987	Stabsarzt bei der Bundeswehr in Kassel-Rothwesten
8.-11.Dez. 1987	Hospitant im HLA-Labor, Prof. E. Albert der Ludwig- Maximilians-Universität München
4.-27.Jan. 1988	Gastarzt auf der Knochenmarktransplantationsstation der Universitätsklinik Charlottenburg Berlin

